

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 012**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 47/48</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 39/385</b>	(2006.01)		
<b>B82Y 5/00</b>	(2011.01)		
<b>C07K 16/16</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/40</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/44</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/46</b>	(2006.01)		
<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2013 PCT/EP2013/064100**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006124**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2013 E 13737565 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2869848**

54 Título: **Conjugados de antígeno-anticuerpo unidos covalentemente**

30 Prioridad:

**04.07.2012 EP 12174947**

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

**02.03.2017**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BENZ, JOERG;  
BRINKMANN, ULRICH;  
DENGL, STEFAN;  
DZIADEK, SEBASTIAN;  
GEORGES, GUY;  
GROTE, MICHAEL;  
HAAS, ALEXANDER y  
HOFFMANN, EIKE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 604 012 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**

Conjugados de antígeno-anticuerpo unidos covalentemente

5 En la presente memoria se informa de complejos que comprenden un antígeno y un anticuerpo en los que los componentes del complejo se encuentran unidos covalentemente entre sí mediante un enlace sencillo. Además, se informa de métodos para producir los complejos covalentes y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Las restricciones principales a la aplicación terapéutica de los polipéptidos son sus limitadas solubilidad, estabilidad in vivo, corta semivida en suero y rápida eliminación del flujo sanguíneo.

15 Se informa de diferentes enfoques para superar dichas desventajas. Sin embargo, ninguna de dichas tecnologías proporciona una plataforma robusta y universal que permite la modulación farmacocinética (FQ) sin presentar riesgos de inmunogenicidad o la potencial pérdida de actividad biológica.

20 Un enfoque para mejorar la FQ/estabilidad y el comportamiento biofísico de los polipéptidos terapéuticos es fusionarlos con entidades que estabilizan el polipéptido, lo mantienen en solución y prolongan su semivida. Son ejemplos de dichas entidades la albúmina de suero humano o las regiones Fc de inmunoglobulina humana. Dicho enfoque es aplicable a muchos polipéptidos lineales que están compuestos de residuos aminoácidos naturales y que toleran modificaciones en el extremo C-terminal o N-terminal sin perder su actividad biológica. Los polipéptidos que son cíclicos, cosidos, contienen residuos aminoácidos no naturales o modificaciones adicionales, no pueden producirse recombinantemente en forma de polipéptidos de fusión. Sin embargo, dichos polipéptidos pueden ser la elección deseada para aplicaciones terapéuticas debido a que frecuentemente resultan superiores a los péptidos lineales 'normales' en términos de estabilidad frente a proteasas, actividad y especificidad.

25 Un enfoque de mejora de la FQ/estabilidad y el comportamiento biofísico de los polipéptidos terapéuticos que también puede aplicarse a los que son cíclicos, cosidos o contienen estructuras no naturales es la conjugación química o enzimática con polímeros, por ejemplo mediante PEGilación o HESilación. Sin embargo, dichas modificaciones con frecuencia conducen a una reducción significativa de la actividad biológica del polipéptido y pueden, bajo determinadas circunstancias, ser la causa de problemas de seguridad o toxicidad.

30 Una desventaja importante de la mayoría de tecnologías de acoplamiento químico actuales para la estabilización o modulación FQ de los polipéptidos terapéuticos es su complejidad. Aparte de la etapa de acoplamiento químico, los métodos resultan en muchos casos en una mezcla de derivados polipeptídicos que están conectados a la entidad moduladora de la FQ bajo estequiometrías indeterminadas y/o en posiciones indeterminadas. Además, las tecnologías de modificación de polipéptidos utilizadas actualmente con frecuencia resultan en que el polipéptido terapéutico experimenta una fuerte reducción o incluso la pérdida total de su actividad biológica. Además, resulta difícil predecir las propiedades farmacológicas y/o las posibles vías de degradación de los conjugados químicos.

35 La patente US nº 5.804.371 informa de péptidos marcados con hapteno y la utilización de los mismos en un método inmunológico de detección. Un péptido marcado con digoxigenina (bradiquinina) y la aplicación del mismo a un inmunoensayo quimioluminenzimático de la bradiquinina en tejidos inflamados se informa en Decarie A. et al. (Peptides 15:511-518, 1994).

40 En el documento nº WO 2004/065569 se informa de anticuerpos multifuncionales. En el documento nº WO 2011/003557 se informa de un complejo de anticuerpo biespecífico y digoxigenina conjugada con un agente terapéutico o diagnóstico.

Descripción resumida de la invención

45 Se ha encontrado que mediante el acoplamiento covalente de un compuesto haptencilado con un anticuerpo anti-hapteno, puede conseguirse una estabilización y mejora de las propiedades FQ del compuesto.

50 Un aspecto tal como se informa en la presente memoria es un conjugado que comprende un antígeno o hapteno y un anticuerpo que se une específicamente al antígeno o hapteno caracterizado por un enlace covalente entre el antígeno hapteno y un residuo de cisteína en la posición 52b o en la posición 53 según la numeración de Kabat del dominio variable de cadena pesada en la RDC2 de cadena pesada del anticuerpo, en el que se determina RDC2 según Kabat.

55 Se ha encontrado que puede utilizarse cualquier antígeno en los conjugados y métodos informados en la presente memoria tras la derivatización con un conector universal que comprende el residuo funcional para la formación del

enlace covalente entre el antígeno y un residuo aminoácido en RDC2 del anticuerpo. La localización del grupo funcional en el conector universal presenta la desventaja de que no resulta necesario para rediseñar la síntesis y la posición del grupo funcional en la RDC2 del anticuerpo.

- 5 Se informa en la presente memoria de un conjugado que comprende un compuesto haptencilado y un anticuerpo que se une específicamente al hapteno del compuesto haptencilado (anticuerpo antihapteno) caracterizado por un enlace covalente entre el compuesto haptencilado y un residuo aminoácido en la RDC2 del anticuerpo, en el que se determina RDC2 según Kabat.
- 10 La RDC2 es la RDC2 de cadena pesada.
- En una realización de todos los aspectos, el compuesto haptencilado comprende un hapteno, un conector opcional y una carga.
- 15 En una realización de todos los aspectos, el enlace covalente se establece entre el conector del compuesto haptencilado y un residuo aminoácido en la RDC2 del anticuerpo.
- En una realización de todos los aspectos, el enlace covalente se establece entre el grupo funcional en el compuesto haptencilado y el residuo aminoácido en la RDC2 del anticuerpo.
- 20 En una realización, el grupo funcional se encuentra en el conector del compuesto haptencilado.
- En una realización de todos los aspectos tal como se informan en la presente memoria, el enlace covalente se establece entre un residuo cisteína en la RDC2 de la cadena pesada del anticuerpo y un grupo funcional en el antígeno o un grupo funcional en el compuesto haptencilado.
- 25 En una realización, el residuo cisteína en la RDC2 de la cadena pesada del anticuerpo se encuentra en la posición 52b o en la posición 53 según la numeración de Kabat del dominio variable de cadena pesada.
- 30 En una realización de todos los aspectos, el enlace covalente es un enlace disulfuro.
- En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera especificidad de unión a un primer antígeno o un primer hapteno y una segunda especificidad de unión a un segundo antígeno o a un segundo hapteno, en el que el primer antígeno/hapteno es diferente del segundo antígeno/hapteno.
- 35 En una realización, el anticuerpo comprende una primera especificidad de unión a un primer hapteno y una segunda especificidad de unión a un segundo hapteno.
- 40 En una realización, el anticuerpo comprende una primera especificidad de unión a un hapteno y una segunda especificidad de unión a un segundo antígeno (no hapteno).
- En una realización el antígeno (no hapteno) es un antígeno de superficie celular. En una realización, el antígeno de superficie celular es un antígeno asociado a tumor.
- 45 En una realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa. En una realización, una cadena pesada del anticuerpo biespecífico comprende una mutación de ojal y la otra cadena respectiva comprende una mutación de botón.
- 50 En una realización de todos los aspectos, la carga se selecciona de entre una fracción de unión, una fracción de marcaje y una fracción biológicamente activa.
- En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
- 55 En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano.
- En una realización, la región constante del anticuerpo es de la subclase IgG1 o de la subclase IgG4 humana.
- 60 En una realización, el anticuerpo presenta una región constante de la subclase IgG1 con una alanina en las posiciones 234 y 235 y con una glicina en la posición 329 con la numeración según el índice EU de Kabat.
- En una realización, el anticuerpo presenta una región constante de la subclase IgG4 con una prolina en la posición 228, un ácido glutámico en la posición 235 y una glicina en la posición 329 con la numeración según el índice EU de

Kabat.

- 5 En una realización de todos los aspectos tal como se informa en la presente memoria, el anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo. En una realización, el fragmento es un Fab o un (Fab)<sub>2</sub>.
- 10 En una realización de todos los aspectos, el conjugado comprende exactamente un enlace covalente por cada RDC2 de cadena pesada.
- 15 En una realización de todos los aspectos tal como se informan en la presente memoria, el antígeno o el compuesto haptencilado comprende un grupo reactivo que puede formar un enlace covalente con el grupo tiol del residuo cisteína en la RDC2 del anticuerpo. En una realización, el grupo reactivo es un tiol, o una maleimida, o un haloacetilo.
- 20 En una realización de todos los aspectos tal como se informan en la presente memoria, el enlace covalente es un enlace disulfuro y se forma sin la adición de agentes redox activos.
- 25 En una realización de todos los aspectos, el conjugado comprende una fracción terapéutica o detectable. En una realización, la fracción terapéutica o detectable se conjuga covalentemente en el antígeno o el hapteno.
- 30 En una realización, el antígeno o el hapteno se conjuga con un polipéptido que consiste de 5 a 60 residuos aminoácidos. En una realización, el polipéptido comprende 10 a 50 residuos aminoácidos. En una realización, el polipéptido comprende 12 a 40 residuos aminoácidos. En una realización, el polipéptido comprende 12 a 30 residuos aminoácidos.
- 35 En una realización, el antígeno o el hapteno se conjuga con un marcaje detectable.
- 40 En una realización, el antígeno o el hapteno se conjuga con el polipéptido, o con el marcaje detectable, o con la carga mediante un conector. En una realización, el conector es un conector no peptídico.
- 45 Un aspecto tal como se informa en la presente memoria es un anticuerpo que presenta en la cadena pesada un residuo cisteína en la RDC2, en la que las RDC se determinan según Kabat, en la que el residuo cisteína en la RDC2 de la cadena pesada del anticuerpo se encuentra en la posición 52b o en la posición 53 según la numeración del dominio variable de cadena pesada de Kabat.
- 50 En una realización, el anticuerpo presenta exactamente un dominio variable de cadena pesada, un residuo cisteína en la posición 52b o en la posición 53.
- 55 En una realización, el hapteno es biotina, o teofilina, o digoxigenina, o carborano o fluoresceína.
- 60 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano.
- En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, o un Fab, o un scFv o un scFv conjugado con una región Fc.
- En una realización, la cisteína forma un enlace disulfuro con un residuo cisteína aislado o un residuo homocisteína aislado.
- En la presente memoria se informa de un inmunoc conjugado que comprende el conjugado indicado en la presente memoria y un agente citotóxico.
- Un aspecto tal como se informa en la presente memoria es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo tal como se informa en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable.
- El conjugado tal como se informa en la presente memoria es para la utilización como medicamento.
- El conjugado tal como se informa en la presente memoria es para el tratamiento del cáncer.
- El conjugado tal como se informa en la presente memoria es para el tratamiento de la diabetes.
- El conjugado tal como se informa en la presente memoria es para el tratamiento de la obesidad.
- El conjugado tal como se informa en la presente memoria es para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.



El conjugado tal como se informa en la presente memoria es para el tratamiento de una enfermedad metabólica.

El conjugado tal como se informa en la presente memoria es para el tratamiento de una enfermedad vírica.

5 Otro aspecto tal como se indica en la presente memoria es la utilización de un conjugado dado a conocer en la presente memoria para la preparación de un medicamento.

10 En la presente memoria se informa de la utilización de un conjugado tal como se informa en la presente memoria como agente diagnóstico. En la presente memoria se informa de la utilización de un conjugado tal como se informa en la presente memoria que comprende un polipéptido terapéutico para incrementar la estabilidad del polipéptido terapéutico. En la presente memoria se informa de la utilización de un conjugado tal como se informa en la presente memoria que comprende un polipéptido terapéutico para incrementar la estabilidad del polipéptido terapéutico. En la presente memoria se informa de la utilización de un conjugado tal como se informa en la presente memoria que comprende un polipéptido terapéutico para incrementar la semivida in vivo del polipéptido terapéutico.

15 En la presente memoria se informa de la utilización de un conjugado tal como se informa en la presente memoria para el tratamiento de una enfermedad.

20 Se informa en la presente memoria es un método para el tratamiento de un individuo que presenta una enfermedad que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz de un conjugado tal como se informa en la presente memoria.

25 Se informa en la presente memoria de un método para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz de un conjugado tal como se informa en la presente memoria.

En una realización, la enfermedad es el cáncer.

30 En una realización, la enfermedad es la diabetes.

En una realización, la enfermedad es la obesidad.

35 En la presente memoria se informa de un método para producir un conjugado tal como se informa en la presente memoria que comprende la combinación de un anticuerpo que comprende un primer grupo reactivo y un antígeno que presenta un segundo grupo reactivo en el que el átomo de carbono alfa del residuo aminoácido que porta el primer grupo reactivo está separado por aproximadamente 10 a 11 Angstroms del átomo del antígeno con el que se encuentra fusionado el conector.

40 En la presente memoria se informa de un método para producir un conjugado tal como se informa en la presente memoria que comprende las etapas siguientes:

- 45 - combinar en solución un anticuerpo que se une específicamente a un hapteno y que comprende un grupo reactivo en un residuo aminoácido de RDC2 con un compuesto haptenilado que comprende un grupo reactivo, en el que el compuesto haptenilado comprende una carga, tal como un péptido que consiste de 5 a 60 aminoácidos de un marcaje detectable, y
- recuperar el conjugado a partir de la solución.

50 En la presente memoria se informa de un método para producir un anticuerpo para la formación de un conjugado tal como se informa en la presente memoria, que comprende las etapas siguientes:

- cultivar una célula que comprende un ácido nucleico codificante del anticuerpo, y
- 55 - recuperar el anticuerpo a partir de la célula o del medio de cultivo, en el que en el anticuerpo, el residuo en la RDC2 de cadena pesada está mutado a cisteína que presenta en la estructura de rayos X del complejo no covalente del anticuerpo y su antígeno o un compuesto haptenilado, una distancia de 10 a 11 Angstroms entre el átomo de carbono alfa del residuo aminoácido en la RDC2 de anticuerpo y el átomo del hapteno al que se encuentra conectado el conector o a un átomo de antígeno, entre los cuales debe formarse el enlace covalente.

60 En la presente informa se informa de un método para identificar una posición en una RDC2 de anticuerpo que puede mutarse en cisteína para la formación de un enlace covalente entre el residuo en la RDC2 de anticuerpo y el antígeno o compuesto haptenilado unido, que comprende las etapas siguientes:

- proporcionar una estructura cristalina del complejo no covalente del anticuerpo y el antígeno o compuesto haptenilado, en el que el antígeno o compuesto haptenilado comprende una secuencia de conector, y

5 - identificar un residuo aminoácido en la RDC2 del anticuerpo y en la secuencia del conector con una distancia de 10 a 11 Angstroms entre los átomos de carbono alfa del residuo aminoácido en la RDC2 de anticuerpo y el átomo en el antígeno al que se encuentra fusionado el conector,

10 en el que la posición identificada es la posición en una RDC2 de anticuerpo que puede mutarse en cisteína para la formación de un enlace covalente entre el residuo en la RDC2 de anticuerpo y el antígeno o compuesto haptenilado unido.

15 En la presente memoria se informa de un anticuerpo biespecífico para la administración dirigida de un compuesto haptenilado en una célula diana, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión que se une específicamente al compuesto haptenilado y una segunda especificidad de unión que se une específicamente a un marcador de superficie celular de la célula.

Descripción de las figuras

20 Figura 1: procedimiento para la digoxigenilación (conjugación de digoxigenina a) de los péptidos (figura 1A). Ejemplos de un marcaje digoxigenilado (fluoróforo Dig-Cy5, figura 1B) y de un polipéptido digoxigenilado (derivado PYY (DIG-PYY), figura 1C).

25 Figura 2: esquema de un complejo de un anticuerpo bivalente mono-específico anti-digoxigenina y un conjugado digoxigenina-Cy5 (figura 2A) y de un complejo de un anticuerpo bivalente mono-específico anti-digoxigenina y un conjugado digoxigenina-polipéptido (figura 2B). Esquema de un complejo de anticuerpo tetravalente biespecífico anti-digoxigenina y un conjugado digoxigenina-polipéptido (figura 2C).

30 Figura 3: cromatograma de exclusión por tamaño (registrado a 280 nm) de un complejo que comprende un anticuerpo anti-digoxigenina y digoxigenina que se encuentra conjugada con un péptido (DIG-PYY), que muestra un único pico de un complejo de tamaño definido.

35 Figura 4: A: modelo de estructura de un Fab anti-digoxigenina (izquierda) que muestra que la digoxigenina (en un círculo) se encuentra capturada en un bolsillo profundo formado por las RDC de las regiones VH y VL. B: modelo de estructura de un Fab anti-biotina (derecha) que muestra que la biocitina (en un círculo) se encuentra capturada en un bolsillo profundo formado por las RDC de las regiones VH y VL.

40 Figura 5: comparación de la unión de anticuerpo humanizados recombinantes anti-biotina con y sin mutación VH53C introducida. Se analizaron las propiedades de unión mediante la tecnología de resonancia del plasmón superficial (RPS) utilizando un instrumento BIAcore T100 o BIAcore 3000. a) anticuerpo humanizado anti-biotina. Unión de ARNip biotinilado a anticuerpo humanizado anti-biotina,  $K_D=624$  pM; b) anticuerpo humanizado con mutación de Cys53 anti-biotina. Unión de ARNip biotinilado,  $K_D=643$  pM; concentraciones de ARNip: 0,14, 0,41, 1,23, 3,70, 11,1, 33,3 y 100 nM; concentración de anticuerpo anti-biotina: 2 nM; chip sensor CM3; unión de anticuerpo mediante anticuerpo Fc anti-IgG humana.

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
anticuerpo humanizado VH53C anti-biotina	$2,2 \cdot 10^7$	0,01	$6,4 \cdot 10^{-10}$
anticuerpo humanizado anti-biotina	$2,0 \cdot 10^7$	0,01	$6,2 \cdot 10^{-10}$

50 Figura 6: la introducción de funcionalidades SH en el hapteno, así como en el anticuerpo, en posiciones apropiadas permite que el anticuerpo y el hapteno formen un enlace covalente entre ellos, resultando en un conjugado.

Figura 7: esquema del patrón de bandas de autofluorescencia en SDS-PAGE (sin tinción adicional del gel de SDS-PAGE):

55 A: en el caso de que no se forme enlace covalente entre el anticuerpo y el conjugado hapteno-fluoróforo tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras, se detecta una banda autofluorescente en el peso molecular del conjugado hapteno-fluoróforo libre.

60 B: en el caso de que no se forme enlace covalente entre el anticuerpo y el conjugado hapteno-fluoróforo tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras, se detecta una banda autofluorescente en el peso molecular combinado de anticuerpo y conjugado hapteno-fluoróforo. Bajo condiciones

reductoras, los puentes disulfuro en el conjugado del anticuerpo y del conjugado hapteno-fluoróforo (compuesto haptencilado) resultan cortados y se detecta una banda autofluorescente en el peso molecular del conjugado hapteno-fluoróforo libre.

5      Figura 8: formación de conjugado de los anticuerpos con Cys mutado ligantes de hapteno con conjugados de hapteno-Cys-marcaje fluorescente (compuesto haptencilado) en presencia de agentes redox activos: agente de oxidación (disulfuro de glutatión, GSSG) y agente reductor (ditioeritritol, DTE): el  
10      acomplejamiento de anticuerpos y el posterior enlace covalente en posiciones definidas se detecta mediante señales de fluorescencia en los análisis de SDS-PAGE. Los análisis de SDS-PAGE no  
15      reductor (imágenes superiores) y reductor (imágenes inferiores) se llevaron a cabo tal como se indica en el Ejemplo 11. Los haptenos unidos covalentemente a anticuerpo son detectables como señales de proteína unida de mayor tamaño en las posiciones apropiadas bajo condiciones no reductoras. Estas señales se separan de la proteína con la reducción y resultan visibles como entidades pequeñas bajo condiciones reductoras.

Izquierda: imagen de fluorescencia.

Derecha: tinción con azul de Coomassie.

Serie 1: anticuerpo anti-digoxigenina con mutación 52bC.

Serie 2: anticuerpo anti-digoxigenina con residuo de tipo salvaje en la posición 52b.

20

- (A) acoplamiento covalente con DTE 3 mM y GSSG 10 mM,
- (B) acoplamiento covalente con DTE 0,3 mM y GSSG 1 mM,
- (C) acoplamiento covalente con DTE 0,03 mM y GSSG 0,1 mM.

25      Figura 9: formación de complejo de anticuerpos con Cys mutado ligantes de hapteno con conjugados hapteno-Cys-marcaje fluorescente en presencia de únicamente un agente de oxidación (disulfuro de glutatión, GSSG) aunque en presencia de agentes reductores o en ausencia de ambos: el acomplejamiento de anticuerpos y el posterior enlace covalente en posiciones definidas se detecta mediante señales de fluorescencia en los análisis de SDS-PAGE. Los análisis de SDS-PAGE no reductor (imágenes superiores) y reductor (imágenes inferiores) se llevaron a cabo tal como se indica en el Ejemplo 12. Los haptenos unidos covalentemente a anticuerpo son detectables como señales de proteína unida de mayor tamaño en las posiciones apropiadas bajo condiciones no reductoras. Estas señales se separan de la proteína con la reducción y resultan visibles como entidades pequeñas bajo condiciones reductoras.

35

Izquierda: imagen de fluorescencia.

Derecha: tinción con azul de Coomassie.

Serie 1: anticuerpo anti-digoxigenina con mutación 52bC.

Serie 2: anticuerpo anti-digoxigenina con residuo de tipo salvaje en la posición 52b.

40

- (A) sin aditivos,
- (B) acoplamiento covalente con GSSG 1 mM,
- (C) acoplamiento covalente con GSSG 0,1 mM.

45      Figura 10: estructura de Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>).

Figura 11: estructura de DIG-3-cme-eda-Cy5.

Figura 12: estructura de DIG-maleimida-Cy5.

50

Figura 13: estructura de DIG-eda-Cys-Cy5.

Figura 14: estructura de DIG-Ahx-Cys-Cy5.

55      Figura 15: estructura de DIG-Cys-MR121.

Figura 16: estructura de Ac-PYY(PEG3-Dig).

Figura 17: estructura de Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig).

60

Figura 18: estructura de PEG3-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig).

Figura 19: estructura de Dy636-eda-Btn.

- Figura 20: estructura de Dy636-Ser-Btn.
- Figura 21: estructura de Dy636-Cys-Btn.
- Figura 22: estructura de Cy5-Cys-Btn.
- Figura 23: estructura de Cy5-Ser-Btn.
- Figura 24: estructura de Ac-PYY(PEG2-Btn).
- Figura 25: estructura de Ac-PYY-PEG3-Cys-13-Ala-Btn).
- Figura 26: estructura de Ac-PYY-PEG3-Ser-PEG2-Btn.
- Figura 27: estructura de Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2-Btn.
- Figura 28: estructura de Ac-PYY(PEG3-Cys-4-Abu-5-Fluo).
- Figura 29: estructura de Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo).
- Figura 30: esquema para la generación de Ac-PYY(PEG2-Btn).
- Figura 31: esquema para la generación de Ac-PYY(PEG3-Cys-13-Ala-Btn).
- Figura 32: esquema para la generación de Ac-PYY(PEG3-Cys-4-Aby-Dig).
- Figura 33: estructura de rayos X de anticuerpo murino anti-biotina en complejo con biocitina. Los residuos aminoácidos que interactúan con biocitina se muestran en una representación de barras.
- Figura 34: resultados del estudio FQ in vivo de sangre con conjugados covalentes y complejos no covalentes en comparación con antígeno/hapteno no acoplado; se muestra la intensidad de fluorescencia relativa remanente (%; símbolos negros) de fluorescencia mediada por Cy5 de complejos no covalentes de biotina-Cy5 (figura 34A) y de conjugados covalentes (con puentes SS) (figura 35B), así como de biotina-Ser-Cy5 no acoplada (cruces); la señal de fluorescencia en el punto temporal  $t=0,08$  h se fijó en 100%; además, se muestra la cantidad relativa remanente de IgG humana en muestras de suero de ratón (símbolos blancos); la concentración sérica de IgG (mg/ml) en  $t=0,08$  h se fijó en el 100%.
- Figura 35: transferencia western de la determinación de la cantidad de polipéptido PYY digoxigenilado en el suero de ratones.
- Figura 36: análisis de acopleamiento controlado por afinidad de compuestos haptenilados con anticuerpos anti-hapteno.  
El acopleamiento de anticuerpos y el posterior enlace covalente en posiciones definidas se detecta mediante señales de fluorescencia en los análisis de SDS-PAGE, los cuales se llevaron a cabo tal como se indica en el Ejemplo 19.
- Izquierda: imagen fluorescente con muestras no reducidas (lado izquierdo del gel) y reducidas (lado derecho del gel).  
Derecha: tinción con azul de Coomassie.
- 1: anticuerpo humanizado anti-digoxigenina + biotina-Cys-Cy5.
  - 2: anticuerpo humanizado VH52bC anti-digoxigenina + biotina-Cys-Cy5.
  - 3: anticuerpo humanizado anti-biotina + biotina-Cys-Cy5.
  - 4: anticuerpo humanizado VH53C anti-biotina + biotina-Cys-Cy5.
- Las flechas blancas marcan biotina-Cys-Cy5 (no acoplado) en exceso, que se encontraba en cantidad significativamente superior al utilizar anticuerpo VH52bC anti-digoxigenina debido a que la reacción de conjugación no se encuentra controlada por afinidad en este caso.
- Figura 37: posiciones de cisteína y patrones de disulfuros dentro de la región Fab, requerida para formar un anticuerpo de unión a Dig con una cisteína adicional en la posición 52b para el acoplamiento de carga covalente dirigido a sitio mediado por hapteno. (A) Cisteínas y patrón de disulfuros en los dominios VH y

CH1 y en los dominios VL y CL que resultan necesarios para formar fragmentos Fab funcionales. (B) Cisteínas y patrón de disulfuros en los dominios VH y CH1 y en los dominios VL y CL que resultan necesarios para formar fragmentos Fab funcionales con cisteína adicional en la posición 52b para el acoplamiento de carga covalente dirigida a sitio mediada por hapteno. (C y D) Potencial de formación de enlaces disulfuro incorrectos dentro del dominio VH de la variante VH52b que resultarían en anticuerpos incorrectamente plegados no funcionales. (E) Ejemplo de potencial enlace disulfuro interdominios incorrecto dentro de la región Fv de la variante VH52b que resultaría en anticuerpos incorrectamente plegados no funcionales.

5  
10  
15  
20

Figura 38: posiciones de cisteína y patrones de disulfuros requeridos para formar un Fv de cadena sencilla estabilizado por disulfuros ligante de Dig con cisteína adicional en la posición 52b para el acoplamiento de carga covalente dirigido a sitio mediado por hapteno. (A) Cisteínas en los dominios VH y VL que resultan necesarios para formar scFv, dsscFv y dsscFv con mutación 52b funcionales. (B) Patrón correcto de enlaces disulfuro que deben formarse para generar scFv, dsscFv y dsscFv con mutación 52b funcionales. (C) Potencial de formación de enlaces disulfuro incorrectos que resultarían en scFv no funcionales incorrectamente plegados. (D) Potencial de formación de enlaces disulfuro incorrectos que resultarían en dsscFv no funcionales incorrectamente plegados. (E) Potencial de formación de enlaces disulfuro incorrectos que resultarían en dsscFv con mutación 52b incorrectamente plegados no funcionales.

25

Figura 39: composición de un derivado de anticuerpo biespecífico LeY-Dig como vehículo de administración para cargas unidas covalentemente.

Figura 40: expresión y purificación de derivados de anticuerpo anti-hapteno biespecífico para la administración dirigida de cargas acopladas covalentemente.

(A) Para los análisis de transferencia western, se sometieron sobrenadantes de cultivo celular a SDS-PAGE (gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (1,0 mm x 12 pocillos) (Invitrogen, nº de cat. NP0322) y las proteínas se transfirieron seguidamente a membranas de transferencia Immobilon (Immobilon-P) (Millipore, nº de cat. IPVH07850), PVDF con tamaño de poro: 0,45 µm. Se detectaron derivados de anticuerpo con el anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana-fosfatasa alcalina producida en cabras (purificada mediante afinidad), Sigma (nº de cat. A3813) a una dilución 1:1.000 y anticuerpo anti-IgG humana (específica de Fc)-fosfatasa alcalina producida en cabras, Sigma (nº de cat. A9544) a una dilución de 1:1.000. Se aplicó el sustrato líquido BCIP/NBT-Blue (Sigma, nº de cat. B3804) para el revelado de la transferencia western. Carril 1 - marcador de peso molecular; carriles 2 y 3 - anticuerpo de control con cadena pesada no modificada; carril 4 - anticuerpo biespecífico LeY-Dig(52bC) con cadena H extendida.

(B) El análisis de SDS-PAGE (gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris [Invitrogen]) y posterior tinción con azul brillante de Coomassie de muestra la pureza de las proteínas de proteína y visualiza las cadenas polipeptídicas relacionadas con IgG con tamaños moleculares aparentes que corresponden a sus pesos moleculares calculados. Carril 1 - marcador de peso molecular; carril 2 - anticuerpo biespecífico Ley-Dig(52bC) con cadena H extendida reducido, carril 3 - anticuerpo biespecífico LeY-Dig(52bC) con cadena pesada extendida no reducido; (C) la cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 20) demuestra la homogeneidad y falta de agregados en las preparaciones de proteínas del derivado de anticuerpo biespecífico LeY-Dig(52bC) tras la purificación con proteína A.

Figura 41: intensidad de fluorescencia relativa remanente (%) de fluorescencia mediada por Cy5 de complejos no covalentes Dig-Cy5 y conjugados covalentes (con puente disulfuro), así como de Dig-Cy5 no acomplejado; la señal de fluorescencia en el punto temporal t=0,08 h se fijó en 100%; además, se muestra la cantidad relativa remanente de IgG humana en las muestras de suero de ratón; se fijó la concentración sérica de IgG (mg/ml) en t=0,08 h en 100%.

Figura 42: farmacocinética bajo condiciones similares a las in vivo de fluorescencia mediada por Cy5 de biotina-Cy5 de complejos no covalentes y de conjugados covalentes (con puentes disulfuro), así como de biotina-Cy5 no acomplejado, determinada mediante la obtención de imágenes oculares no invasivas; rombos negros: biotina-Cy5; cuadrados negros: biotina-Cy5+anticuerpo anti-biotina (complejo); triángulos: conjugado de C5-biotina-anticuerpo anti-biotina.

Figura 43: a) Composición, estructura y peso molecular de teofilina-Cys-Cy5; b) la cromatografía de exclusión por tamaño demuestra la pureza y homogeneidad de variantes de anticuerpo purificadas ligantes de teofilina; el pico nº 2 muestra el producto purificado; la falta de pico nº 1 indica que dichas preparaciones están libres de agregados; c) formación de complejos covalentes entre los anticuerpos ligantes de teofilina y teofilina-Cys-Cy5 tal como demuestra la SDS-PAGE no reductora (carriles izquierdos) y la

reductora (carriles derechos); Cy5 aparentemente se encuentra acoplado a la cadena H bajo condiciones no reductoras únicamente en muestras que contenían teofilina-Cys-Cy5 y anticuerpos con Cys mutadas, estos conjugados covalentes se desintegran con la reducción (carriles derechos); carriles 1: marcador de peso molecular; 2-4 no reductor -2: anticuerpo anti-teofilina (sin mutación de Cys) + teofilina-Cys-Cy5 (complejo); 3: anticuerpo anti-teofilina-Cys\_55 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado); 4: anticuerpo anti-teofilina-Cys\_54 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado); 5-7 reductor -5: anticuerpo anti-teofilina (sin mutación de Cys) + teofilina-Cys-Cy5 (complejo); 6: anticuerpo anti-teofilina-Cys\_55 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado); 7: anticuerpo anti-teofilina-Cys\_54 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado).

Figura 44: la formación de complejos covalentes entre los anticuerpos ligantes de biotina y biotina-Cys-Cy5 se demuestra mediante SDS-PAGE no reductor y reductor; la reacción de acoplamiento se llevó a cabo en suero murino a 37°C durante 1 h. Cy5 aparentemente se encuentra acoplado con la cadena H bajo condiciones no reductoras únicamente en muestras que contenían biotina-Cys-Cy5 y anticuerpo con mutación de Cys; estos conjugados covalentes se desintegran con la reducción (carriles derechos); carriles 1: marcador de peso molecular; 2-3 no reductor -2: anticuerpo anti-biotina (sin mutación de Cys) + biotina-Cys-Cy5 (complejo); 3: anticuerpo anti-biotina-Cys + biotina-Cys-Cy5 (conjugado); 4-5 reductor -5: anticuerpo anti-biotina (sin mutación de Cys) + biotina-Cys-Cy5 (complejo); 6: anticuerpo anti-biotina-Cys + biotina-Cys-Cy5 (conjugado).

Figura 45: farmacocinética in vivo de fluorescencia mediada por Cy5 de biotina-Cy5 de complejos no covalentes y de conjugados covalentes (con puentes disulfuro), así como de biotina-Cy5 no acomplejado, determinada mediante la obtención de imágenes oculares no invasivas; rombos negros: biotina-Cy5; círculos negros: biotina-Cy5 administrada 24 horas después de la administración de anticuerpo anti-biotina (formación de complejo in vivo); cuadrados negros: biotina-Cys-Cy5 administrada 24 horas después de la administración de anticuerpo-Cys anti-biotina (formación de conjugado in vivo).

Figura 46: se determinó la estructura proteica del fragmento Fab de anticuerpo murino anti-biotina en complejo con biocitinamida: se situó el hapteno acomplejado en estrecha proximidad con un grupo con carga negativa de aminoácidos; la biotina, que (como hapteno) está derivatizada para el acoplamiento de carga en su grupo carboxilo se une con buena eficacia, ya que no existe repulsión de cargas en esta posición (debido a la falta de grupo COOH); en contraste, la biotina libre (normal) no puede unirse eficientemente al anticuerpo debido a que su grupo carboxilo se encontraría en estrecha proximidad a dicho grupo de cargas negativas y por lo tanto resulta repelido.

### 35 Descripción detallada de la invención

#### I. Definiciones

Un "marco humano aceptor" para los fines de la presente memoria es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano, tal como se define posteriormente. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o inferior, de 9 o inferior, de 8 o inferior, de 7 o inferior, de 6 o inferior, de 5 o inferior, de 4 o inferior, de 3 o inferior o de 2 o inferior. En algunas realizaciones, el marco humano aceptor de VL es de secuencia idéntica a la secuencia de marco de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia de marco de consenso humana.

El término "aminoácido" se refiere al grupo de carboxi  $\alpha$ -aminoácidos, naturales, es decir que directamente o en forma de un precursor pueden estar codificados por un ácido nucleico, o que se encuentran presentes de manera no natural. Los aminoácidos naturales individuales están codificados por ácidos nucleicos que consisten de tres nucleótidos, denominados codones o tripletes de bases. Cada aminoácido está codificado por como mínimo un codón. Esto se conoce como "degeneración del código genético". El término "aminoácido" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al grupo de carboxi  $\alpha$ -aminoácidos naturales que comprende alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P.), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V). Entre los ejemplos de aminoácidos no naturales se incluyen, aunque sin limitación, Aad (ácido alfa-aminoadípico), Abu (ácido aminobutírico), Ach (ácido alfa-aminociclohexano-carboxílico), Acp (ácido aminociclopentano-carboxílico), Acpc (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), Aib (ácido alfa-aminoisobutírico), Aic (ácido 2-aminoindano-2-carboxílico, también denominado 2-2-Aic), 1-1-Aic (ácido 1-aminoindano-1-carboxílico), (ácido 2-aminoindano-2-carboxílico), alilglicina (AllylGly), aloisoleucina (allo-Ile), Asu (ácido alfa-aminosubérico, ácido 2-aminooctanodioico), Bip (ácido 4-fenil-fenilalanina-carboxílico), BnHP ((2S,4R)-4-hidroxi-prolina), Cha (beta-

ciclohexilalanina), Cit (citrulina), ciclohexilglicina (Chg), ciclopentilalanina, beta-ciclopropil-alanina, Dab (ácido 1,4-diaminobutírico), Dap (ácido 1,3-diaminopropiónico), ácido p (3,3-difenilalanina-carboxílico), 3,3-difenilalanina, di-n-propilglicina (Dpg), 2-furilalanina, homociclohexilalanina (HoCha), homocitulina (HoCit), homocicloleucina, homoleucina (HoLeu), homoarginina (HoArg), homoserina (HoSer), hidroxiprolina, Lys(Ac), (1) Nal (1-naftil-alanina), (2) Nal (2-naftil-alanina), 4-MeO-Apc (ácido 1-amino-4-(4-metoxifenil)-ciclohexano-1-carboxílico), norleucina (Nle), Nva (norvalina), omatina, 3-Pal (ácido alfa-amino-3-piridilalanina-carboxílico), 4-Pal (ácido alfa-amino-4-piridilalanina-carboxílico), 3,4,5,F3-Phe (3,4,5-trifluoro-fenilalanina), 2,3,4,5,6,F5-Phe (2,3,4,5,6-pentafluoro-fenilalanina), Pqa (ácido 4-oxo-6-(1-piperazinil)-3(4H)-quinazolin-acético (CAS nº 889958-08-1)), piridilalanina, quinolilalanina, sarcosina (Sar), tiazolilalanina, tienilalanina, Tic (ácido alfa-amino-1,2,3,4,tetrahidroisoquinolín-3-carboxílico), Tic(OH), Tle (terc-butilglicina) y Tyr(Me).

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que presentan secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa. Habitualmente las variantes de secuencia de aminoácidos presentarán una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 70% respecto al polipéptido de secuencia nativa. En una realización, la variante presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 80% o superior respecto al polipéptido de secuencia nativa. En una realización, la variante presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 90% o superior respecto al polipéptido de secuencia nativa. En una realización, la variante presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 95% o superior respecto al polipéptido de secuencia nativa. En una realización, la variante presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 98% o superior respecto al polipéptido de secuencia nativa. Las variantes de la secuencia de aminoácidos presentan sustituciones, deleciones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Los aminoácidos se designan por los nombres convencionales, por los códigos de una letra y por los códigos de tres letras.

El término "anticuerpo" en la presente memoria se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo con la condición de que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula diferente de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

El término "biotina", abreviadamente 'BI', se refiere al ácido 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]pentanoico. La biotina también se conoce como vitamina H o coenzima R.

La expresión "anticuerpos biespecíficos" se refiere a anticuerpos que presentan dos especificidades de unión diferentes (antígeno/hapteno). En una realización, los anticuerpos biespecíficos tal como se informa en la presente memoria son específicos para dos antígenos diferentes, es decir, un hapteno y un antígeno no hapteno.

El término "quimérico" referido a un anticuerpo se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\mu$ , respectivamente.

La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o bloquea una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Entre los agentes citotóxicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isótopos radioactivos (por ejemplo at211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina y etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticos; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer dados a conocer posteriormente.

El término "digoxigenina", abreviadamente "DIG", se refiere a 3-[(3S,5R,8R,9S,10S,12R,13S,14S,17R)-3,12,14-

trihidroxi-10,13-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16,17-tetradecahidro-ciclopenta[a]-fenantrén-17-il]-2H-furán-5-ona (CAS número 1672-46-4). La digoxigenina (DIG) es un esteroide presente exclusivamente en las flores y hojas de las plantas *Digitalis purpurea*, *Digitalis orientalis* y *Digitalis lanata* (digital) (Polya G., Biochemical targets of plant bioactive compounds, CRC Press, New York, 2003, página 847).

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase de anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo se incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión de receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo receptores de células B) y activación de las células B.

La expresión "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz a dosis y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos ligantes de antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab)<sub>2</sub> que presenta dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de entrecruzar antígeno.

El fragmento fab contiene además el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos residuos en el extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria para Fab' en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan por lo menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> originalmente se produjeron como parejas de fragmentos Fab' que presentaban cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y un sitio de unión a antígeno. Esta región consiste de un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación no covalente estrecha. Es en esta configuración que interactúan las tres regiones hipervariables de cada dominio variable para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) presenta la capacidad de reconocer y unirse a antígenos, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión entero.

La expresión "región Fc" en la presente memoria se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una parte de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende entre Cys226 o entre Pro230, y el extremo carboxilo-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede encontrarse presente o no. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los residuos aminoácidos en la región Fc o en la región constante se realiza según el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se indica en Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, publicación del NIH nº 91-3242.

El término "fluoresceína", abreviadamente "FLUO", se refiere a 6-hidroxi-9-(2-carboxifenil)-(3H)-xantén-3-on, alternativamente ácido 2-(6-hidroxi-3-oxo-(3H)-xantén-9-il)-benzoico. La fluoresceína también se conoce como resorcinolfaleína, C.I. 45350, solvente amarillo 94, D&C amarillo nº 7, angioflúor, amarillo Japón 201 o jabón amarillo.

El término "marco", abreviadamente "RM", se refiere a residuos aminoácidos de dominio variable de las cadenas pesada y ligera diferentes de los residuos de la región hipervariable (RHV). La RM de un dominio variable generalmente consiste de cuatro dominios de la RM: RM1, RM2, RM3 y RM4. De acuerdo con lo anterior, las secuencias de RHV y de RM generalmente aparecen en la secuencia siguiente en la VH (o VL): RM1-H1(L1)-RM2-H2(L2)-RM3-H3(L3)-RM4.

La expresión "aminoácido cisteína libre" se refiere a un residuo aminoácido cisteína que ha sido introducido artificialmente en un anticuerpo parental, presenta un grupo funcional tiol (SH) y no se encuentra apareado como puente disulfuro intramolecular. Sin embargo, un aminoácido cisteína libre puede encontrarse apareado como puente disulfuro intramolecular, por ejemplo con glutatión.



La expresión "anticuerpo de longitud completa" se refiere a un anticuerpo que presenta una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo nativo o que presenta cadenas pesadas que contienen una región Fc tal como se define en la presente memoria. Los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se encuentran unidas mediante disulfuro. De extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena pesada presenta una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, cada cadena ligera presenta una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o un dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede ser de dos tipos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basados en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Un "anticuerpo de longitud completa" es un anticuerpo que comprende un dominio VL y un dominio VH, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y los dominios constantes de cadena pesada CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de cadena nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo de longitud completa puede presentar una o más "funciones efectoras" que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región constante de Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos se incluyen la unión de C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); la unión de receptores de Fc; la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis y la regulación negativa de los receptores de superficie celular, tales como los receptores de células B y los RCB.

El término "hapteno" se refiere a una molécula pequeña que puede inducir una respuesta inmunológica únicamente en caso de que se encuentre unida a un portador grande, tal como una proteína. Son haptenos ejemplares, anilina, ácido o-, m- y p-aminobenzoico, quinona, histamina-succinil-glicina (HSG), hidralazina, halotano, indio-DTPA, fluoresceína, biotina, digoxigenina, teofilina y dinitrofenol. En una realización, el hapteno es biotina o digoxigenina o teofilina o carborano.

La expresión "un hapteno que se encuentra conjugado con" o "compuesto haptencilado" se refiere a un hapteno que se encuentra unido covalentemente a una fracción adicional, tal como un polipéptido o un marcaje. Los derivados de hapteno activados se utilizan con frecuencia como materiales de partida para la formación de dichos conjugados. En una realización, el hapteno es digoxigenina y se encuentra conjugado (en una realización mediante su grupo 3-hidroxi) con la fracción mediante un conector. En una realización, el conector comprende: a) uno o más (en una realización tres a seis) grupos metilén-carboxi-metilo (-CH<sub>2</sub>-C(O)-) y/o b) 1 a 10 (en una realización 1 a 5) residuos aminoácidos (en una realización seleccionados de entre glicina, serina, glutamato,  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico o lisina) y/o c) uno o más (en una realización uno o dos) compuestos con la fórmula estructural NH<sub>2</sub>-[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH en la que n es 2 o 3 y x es 1 a 10, en una realización 1 a 7. El último elemento resulta (por lo menos parcialmente) en un conector (parte) de fórmula -NH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>x</sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-. Un ejemplo de dicho compuesto es, por ejemplo, ácido 12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (resulta en un conector TEG (trietilenglicol)). En una realización, el conector comprende además un grupo maleimido. El conector presenta un efecto estabilizador y solubilizador ya que contiene cargas y/o puede formar puentes de hidrógeno. Además, puede facilitar estéricamente la unión del anticuerpo anti-hapteno al polipéptido conjugado con hapteno. En una realización, el conector se encuentra situado en una cadena lateral de un aminoácido del polipéptido (por ejemplo conjugado con una cadena lateral de lisina o de cisteína mediante un grupo amino o tiol). En una realización, el conector se encuentra situado en el extremo amino-terminal o en el extremo carboxi-terminal del polipéptido. La posición del conector en el polipéptido típicamente se selecciona en una región en la que la actividad biológica del polipéptido no resulta afectada. Por lo tanto, la posición de unión del conector depende de la naturaleza del polipéptido y de los elementos estructurales relevantes que son responsables de la actividad biológica. La actividad biológica del polipéptido al que se encuentra unido el hapteno puede someterse a ensayo en un ensayo in vitro.

Las expresiones "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se utilizan intercambiamente y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de dichas células. Entre las células huésped se incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma con independencia del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácidos nucleicos de la misma en una célula parental, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado o selección realizado en la célula originalmente transformada se encuentra incluida en la presente memoria.

Un "anticuerpo humano" es uno que presenta una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humano. Dicha definición de un anticuerpo

humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

5 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoácidos de RHV humanas y residuos aminoácidos de RM humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las RHV (por ejemplo las RDC) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las RM corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido sometido a humanización.

15 La expresión "región hipervariable" o "RHV", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable ("regiones determinantes de complementariedad", o "RDC") y/o que forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o que contienen residuos de contacto con antígeno ("contactos de antígeno"). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis RHV, tres en la VH (H1, H2 y H3) y tres en la VL (L1, L2 y L3).

20 Entre las RVH en la presente memoria se incluyen:

- (a) bucles hipervariables presentes en los residuos aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia C. y Lesk A.M., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987),
- (b) RDC presentes en los residuos aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, publicación del NIH Publication nº 91-3242),
- (c) contactos de antígeno presentes en los residuos aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745, 1996) y
- (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los residuos de aminoácidos de RHV 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

30 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Entre los mamíferos se incluyen animales domesticados (por ejemplo vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

35 Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido separado de un componente de su medio natural. En algunas realizaciones, se purifica un anticuerpo hasta una pureza superior a 95% o 99% según se determina mediante, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (EIE), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo de intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos ver, por ejemplo, Flatman S. et al., J. Chrom. B 848:79-87, 2007.

45 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que ha sido separada de un componente de su medio natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácidos nucleicos contenida en células que habitualmente contienen la molécula de ácidos nucleicos pero la molécula de ácidos nucleicos se encuentra presente extracromosómicamente o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

50 La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo que contienen mutaciones naturales o que aparecen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, encontrarse presentes generalmente dichas variantes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que deben utilizarse según la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo, aunque sin limitación, el método del hibridoma, los métodos de ADN recombinante, los métodos de expresión fágica y los métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana, estando descritas en la presente memoria dichos métodos y otros métodos ejemplares para la preparación de anticuerpos monoclonales.

La expresión "anticuerpo mono específico" se refiere a un anticuerpo que presenta uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales presenta la misma especificidad de unión, es decir, se une al mismo antígeno o hapteno.

5 Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no se encuentra conjugado con una fracción heteróloga (por ejemplo una fracción citotóxica) o marcaje radioactivo. El anticuerpo desnudo puede encontrarse presente en una formulación farmacéutica.

10 La expresión "impreso en el envase" se utiliza para referirse a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.

15 Un "anticuerpo parental" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la que se sustituyen uno o más residuos aminoácidos por uno o más residuos de cisteína. El anticuerpo parental puede comprender una secuencia nativa o de tipo salvaje. El anticuerpo parental puede presentar modificaciones de la secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones) respecto a otras formas nativas, de tipo salvaje o modificadas de un anticuerpo. El anticuerpo parental se une específicamente a un hapteno. Un anticuerpo parental puede dirigirse adicionalmente también contra un antígeno diana de interés, por ejemplo un polipéptido biológicamente importante. Los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos también se encuentran contemplados.

20 El término "carga" se refiere a cualquier molécula o combinación de moléculas la actividad de la cual se desea administrar en una célula y/o localizar en una célula. Entre las cargas se incluyen marcajes, citotoxinas (por ejemplo exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina, toxina diftérica y similares), enzimas, factores de crecimiento, factores de transcripción, fármacos, radionucleidos, ligandos, anticuerpos, liposomas, nanopartículas, partículas víricas, citoquinas y similares.

25 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico que resulta útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamilaminas, incluyendo altretamina, trietilén-melamina, trietilén-fosforamida, trietilén-tiofosforamida y trimetilomelamina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitroreinas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisininas, actinomizina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, 30 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxireina; lentinano; lonidamina; mitogazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofillínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; 35 navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-II; inhibidor de topoisomerasa 35 RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriormente indicados. También se encuentran incluidas en la presente definición, agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores, tales como antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, imidazoles 40 inhibidores de aromatasas 4(5), 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston), y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido y goserelina, y sales, ácido o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriormente indicados.

Un "agente antiangiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea o interfiere en cierta medida con el desarrollo de los vasos sanguíneos. El agente antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o un anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o un receptor de factor de crecimiento que participa en la estimulación de la angiogénesis. El factor antiangiogénico es, en una realización, un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV).

El término "citoquina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citoquinas, linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se encuentran incluidas entre las citoquinas una hormona del crecimiento tal como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil-hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina; hormonas glucoproteicas tales como la hormona folículo-estimulante (HFE), la hormona estimulante del tiroides (HET) y la hormona luteinizante (HL), el factor de crecimiento hepático, el factor de crecimiento fibroblástico, la prolactina, el lactógeno placentario, el factor a y P de necrosis tumoral, la sustancia inhibidora mulleriana, el péptido asociado a gonadotropina de ratón, la inhibina, la activina, el factor de crecimiento endotelial vascular, la integrina, la trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nervioso tales como NFG-p; el factor de crecimiento plaquetario, los factores de crecimiento transformante (FCT), tales como FCT-a y FCT-p; los factores I y II de crecimiento similar a la insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoconductores; interferones tales como el interferón-a, -P y -y; los factores estimulantes de colonias (FEC) tales como FEC de macrófagos (M-FEC), FEC de granulocitos-macrófagos (FEC-GM) y FEC de granulocitos (FECG); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 e IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como FNT- $\alpha$  o FNT-P, y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y ligando de kit (LK). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de un cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "fMLF" se refiere al tripéptido que consiste de N-formilmetionina, leucina y fenilalanina. En una realización, la fracción efectora es fMLF o un derivado del mismo.

El término "profármaco" se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que resulta menos citotóxica para las células tumorales que el fármaco parental y que es capaz de ser enzimáticamente activa o convertida en la forma parental más activa. Ver, por ejemplo, wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions, vol. 14, 615th Meeting Belfast, 1986, páginas 375 a 382, y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borhardt et al. (editores), páginas 247 a 267, Humana Press, 1985. Entre los profármacos que pueden utilizarse como fracción efectora se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosfosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen b-lactamo, profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituidos opcionalmente o profármacos que contienen fenilacetamida sustituidos opcionalmente, 5-fluorocitosina y otros fármacos 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre de citotoxicidad más activo. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para la utilización en la presente invención se incluyen los agentes quimioterapéuticos indicados en la presente memoria.

La expresión "fracción citotóxica" se refiere a una sustancia que inhibe o bloquea una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Entre los agentes citotóxicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isótopos radioactivos (por ejemplo At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina y etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticos; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer dados a conocer posteriormente.

La expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede realizarse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo utilizando software informático disponible públicamente, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). El experto en la materia podrá determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos generados

utilizando el programa informático de comparación de secuencias llamado ALIGN-2. El autor del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con la documentación para usuario en el U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en donde se encuentra registrado con el nº TXU510087 del U.S. Copyright Office. El programa ALIGN-2 se encuentra disponible públicamente de Genentech Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para la utilización en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En la situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que presenta o que comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula del modo siguiente:

### 100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de residuos aminoácidos puntuados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de este programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se aprecia que, en el caso de que la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A frente a B no es igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B frente a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente memoria se obtienen tal como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma resulte efectiva, y que no contiene componentes adicionales que resulten inaceptablemente tóxicos para un sujeto en el que se administre la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, diferente de un ingrediente activo, que no resulta tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitación, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

Un "polipéptido" es un polímero que consiste de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos pueden denominarse "péptidos", mientras que las moléculas que consisten de dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos aminoácidos pueden denominarse "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden ser añadidos por la célula, en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar según el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en la presente memoria en términos de la estructura del esqueleto de aminoácidos o el ácido nucleico codificante del mismo. Las adiciones, tales como grupos carbohidrato, generalmente no se especifican, aunque, sin embargo, pueden encontrarse presentes.

Todas las secuencias polipeptídicas están escritas según la convención generalmente aceptada en la que el residuo aminoácido alfa-N-terminal se encuentra a la izquierda y el residuo aminoácido alfa-C-terminal se encuentra a la derecha. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "N-terminal" se refiere al grupo alfa-amino libre de un aminoácido en un polipéptido y la expresión "C-terminal" se refiere al extremo ácido  $\alpha$ -carboxílico libre de un aminoácido en un polipéptido. Un polipéptido que está N-terminado en un grupo se refiere a un polipéptido que porta un grupo en el nitrógeno del alfa-amino del residuo aminoácido N-terminal. Un aminoácido que está N-terminado en un grupo se refiere a un aminoácido que porta un grupo en el nitrógeno alfa-amino.

A menos que se indique lo contrario, un prefijo "D", por ejemplo D-Ala o N-Me-D-Ile, o escrito en formato de letra minúscula, por ejemplo a, i, 1 (versiones D de Ala, Ile y Leu), la estereoquímica del carbono alfa de los aminoácidos y los residuos aminoácidos en los polipéptidos indicados en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, es la configuración natural o "L". Las denominaciones de Cahn-Ingold-Prelog "R" y "S" se utilizan para especificar la estereoquímica de los centros quirales en determinados sustituyentes acilo en el extremo N-terminal de los polipéptidos. La denominación "R,S" pretende indicar una mezcla racémica de las dos formas enantioméricas. Esta nomenclatura sigue la descrita en Cahn R.S. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 5:385-415, 1966.

La expresión "Fv de cadena sencilla", abreviadamente "scFv", se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de anticuerpo, en el que estos dominios se encuentran presentes en una única

cadena polipeptídica. En una realización, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de los fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plückerthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), Springer-Verlag, New York, páginas 269 a 315, 1994.

5 El término "teofilina", abreviadamente "THEO", se refiere a 1,3-dimetil-7H-purín-2,6-diona. La teofilina también se conoce como dimetilxantina.

10 El término "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refieren a la intervención clínica en un intento para alterar el curso natural del individuo bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, prevenir la aparición o recurrencia de una enfermedad, el alivio de síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de una enfermedad y la remisión o la mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, se utilizan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para enlentecer el avance de la misma.

15 La expresión "x-valente", por ejemplo "monovalente" o "bivalente" o "trivalente" o "tetravalente", se refiere a la presencia de un número concreto de sitios de unión, es decir "x", en una molécula de anticuerpo. De esta manera, los términos "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" se refieren a la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una molécula de anticuerpo. Los anticuerpos biespecíficos indicados en la presente memoria son por lo menos "bivalentes" y pueden ser "trivalentes" o "multivalentes" (por ejemplo "tetravalentes" o "hexavalentes"). En una realización, el anticuerpo biespecífico tal como se informa en la presente memoria es bivalente, trivalente o tetravalente. En una realización, el anticuerpo biespecífico es bivalente. En una realización, el anticuerpo biespecífico es trivalente. En una realización, el anticuerpo biespecífico es tetravalente.

20 En determinados aspectos y realizaciones, los anticuerpos informados en la presente memoria presentan dos o más sitios de unión y son biespecíficos. Es decir, los anticuerpos pueden ser biespecíficos incluso en casos en los que presentan más de dos sitios de unión (es decir, de que el anticuerpo sea trivalente o multivalente). La expresión anticuerpos biespecíficos incluye, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla multivalentes, diacuerpos y triacuerpos, así como anticuerpos que presentan la estructura de dominio constante de los anticuerpos de longitud completa a los que se encuentran unidos sitios de unión a antígeno adicionales (por ejemplo Fv de cadena sencilla, un dominio VH y/o un dominio VL, Fab o (Fab)<sub>2</sub>) mediante uno o más conectores peptídicos. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa de una única especie, o ser quimerizados o humanizados. Para un anticuerpo con más de dos sitios de unión a antígeno, algunos sitios de unión pueden ser idénticos, con la condición de que la proteína presente sitios de unión para dos antígenos diferentes. Es decir, mientras que un primer sitio de unión es específico para un hapteno, un segundo sitio de unión específico es específico para un antígeno no hapteno, y viceversa.

30 La expresión "región variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo a su antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente presentan estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco (RM) conservadas y tres regiones hipervariables (RHV) (ver, por ejemplo, Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6a ed., W.H. Freeman and Co., N.Y., 2007, página 91). Un único dominio VH o VL puede resultar suficiente para proporcionar especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno con el fin de cribar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Ver, por ejemplo, Portolano S. *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887, 1993; Clackson T. et al., *Nature* 352:624-628, 1991.

40 El término "vector" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de propagar otro ácido nucleico al que se encuentra unido. El término incluye el vector en forma de estructura de ácidos nucleicos autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que ha sido introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se encuentran ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión".

## 55 II. Conjugados tales como se informan en la presente memoria

60 En un aspecto, la invención se basa en el resultado de que un conjugado covalente que comprende un antígeno y un anticuerpo que se une específicamente al antígeno puede obtenerse mediante la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional correctamente situado en el antígeno y un residuo aminoácido que comprende un grupo funcional en un dominio variable del anticuerpo, especialmente en la RDC2 del anticuerpo, en donde la RDC2 se determina según la numeración de dominio variable de cadena pesada según Kabat.

En determinadas realizaciones, el antígeno es un hapteno. En una realización, el hapteno es biotina o digoxigenina o fluoresceína o teofilina o carborano.

5 En una realización, el antígeno es un compuesto haptencilado. En una realización, el compuesto haptencilado es un conjugado que comprende un hapteno, un conector y una carga. En una realización, el hapteno es biotina o digoxigenina o fluoresceína o teofilina o carborano.

10 En determinadas realizaciones, el grupo funcional puede contener dobles enlaces deficientes en electrones o un tiol. En una realización, el grupo funcional es una maleimida o una cisteína.

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a digoxigenina.

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a biotina.

15 En la presente memoria se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a teofilina.

Debido a que los conjugados tal como se informan en la presente memoria pueden utilizarse como agente terapéutico en el ser humano, en la presente memoria también se proporcionan variantes de los anticuerpos anteriormente indicados contra digoxigenina, biotina y teofilina.

20 Los conjugados covalentes de un conjugado hapteno-polipéptido (compuesto haptencilado) y un anticuerpo antihapteno pueden conferir un comportamiento biofísico benigno y propiedades FQ mejoradas al polipéptido. Además, en el caso de que se utilice un anticuerpo biespecífico, los conjugados pueden utilizarse para dirigir el polipéptido a células que expresan el antígeno que resulta reconocido por la segunda especificidad de unión del anticuerpo biespecífico. Dichos conjugados están compuestos de una especificidad de unión antihapteno y una especificidad de unión a antígeno (no hapteno). La proporción estequiométrica de anticuerpo a conjugado hapteno-polipéptido depende del formato del anticuerpo biespecífico y puede ser 1:1, 1:2, 2:1, 2:2, 2:4 y 4:2 (anticuerpo: hapteno-polipéptido).

30 Se desea que el polipéptido conserva una buena actividad biológica a pesar de estar conjugado con el hapteno, así como a pesar de que esté conjugado con el anticuerpo. También se desea (en el caso de módulos de reconocimiento biespecíficos) que el sitio de unión diana en superficie celular del anticuerpo biespecífico conserve su especificidad y afinidad de unión en presencia del compuesto haptencilado conjugado covalentemente.

35 El grupo reactivo en el antígeno (hapteno) puede ser cualquier grupo reactivo, tal como, por ejemplo, una maleimida, por ejemplo maleimida de N-etilo (NEM), una yodoacetamida, un disulfuro de piridilo u otra pareja de conjugación reactiva (ver, por ejemplo, Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc., 2003; Brinkley, Bioconjugate Chem. 3:2, 1992; Garman, Non-Radioactive Labeling: A Practical Approach, Academic Press, London, 1997; Means, Bioconjugate Chem. 1:2, 1990; Hermanson G. en Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, páginas 40 a 55 y 643 a 671, 1996).

40 El grupo reactivo en el anticuerpo se encuentra limitado a aquellos que pueden generarse selectivamente, es decir, con especificidad de posición. Por lo tanto, se encuentra limitado a los grupos de cadena lateral de los residuos aminoácidos cisteína, serina, asparagina, glutamina, tirosina, lisina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico.

45 Para la formación de un conjugado covalente entre el anticuerpo y el antígeno/hapteno, ambos compuestos deben modificarse mediante la introducción de un grupo reactivo. Con la unión del antígeno/hapteno al anticuerpo, los dos grupos reactivos quedan en estrecha proximidad, permitiendo la formación de un enlace covalente. En una realización, la modificación es la introducción de una funcionalidad tiol en cada uno de los compuestos. En una realización, el compuesto tiol es un residuo cisteína.

50 La posición que debe mutarse debe cumplir simultáneamente dos requisitos: (i) las posiciones de acoplamiento deben encontrarse próximas a la región de unión para utilizar el efecto de posicionamiento del antígeno/hapteno para el acoplamiento directo, e (ii) la mutación y posición de acoplamiento debe situarse de manera que la unión del antígeno/hapteno por sí sola no resulte afectada. Estos requisitos para encontrar una posición adecuada son de hecho 'contradictorias' una de otra debido a que el requisito (i) se satisface mejor con una posición próxima al sitio de unión, mientras que el requisito (ii) se consigue con más seguridad con posiciones alejadas del sitio de unión.

60 A pesar de estos requisitos virtualmente excluyentes, se identificaron posiciones que pueden mutarse sin afectar a la localización del hapteno y que sin embargo permiten simultáneamente el acoplamiento covalente dirigido.

La primera posición se encuentra situada en la posición VH52b o en la posición VH53, respectivamente, según la numeración de Kabat del dominio variable de cadena pesada. En el caso de que el anticuerpo presente una RDC2

de VH corta, que no presenta residuos intermitentes, tales como 52a, 52c, 52c y 52d, la posición es 53 (numeración y alineación según el esquema de numeración y reglas de Kabat para el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo). En el caso de que el anticuerpo presente una RDC2 de VH larga que comprende los residuos 52a y 52b, opcionalmente residuos adicionales 52c y 52d, etc., la posición es 52b (numeración y alineación según el esquema de numeración y reglas de Kabat para el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo).

La segunda posición se encuentra situada en la posición VH28 según la numeración de Kabat.

Por ejemplo, en la estructura del anticuerpo anti-digoxigenina, el hapteno se encuentra unido en un bolsillo profundo formado por residuos hidrofóbicos. Se utilizó un conjugado digoxigenina-Cy5 fluorescente en el presente estudio cristalográfico, en el que el fluoróforo, así como el conector entre la digoxigenina y Cy5, no se encontraban visibles en la estructura debido a una elevada flexibilidad y desorden resultante en el cristal. Sin embargo, el conector y Cy5 se encuentran unidos a O32 de la digoxigenina, lo que apunta en la dirección de la RDC2 de la cadena pesada. La distancia entre O32 de la digoxigenina al C $\alpha$  del residuo aminoácido en la posición 52b según Kabat es de aproximadamente 10,5 Å.

Se ha encontrado que las posiciones son posiciones "universales", es decir, la posición es aplicable a cualquier anticuerpo (anti-hapteno) y, de esta manera, no resulta necesario construir de cero cada vez que un nuevo anticuerpo (anti-hapteno) debe ser modificado, proporcionando la estructura cristalina y determinando la posición apropiada que permite el acoplamiento covalente con hapteno posicionado.

La mutación VH52bC o VH53C, respectivamente, según el esquema de numeración de Kabat, podría utilizarse inesperadamente para cada anticuerpo de unión a hapteno analizado. Aunque los anticuerpos y estructuras de sus bolsillos de unión son bastante diversos, se ha demostrado que la mutación VH52bC/VH53C puede utilizarse para la unión covalente de antígenos/haptenos a anticuerpos ligantes de digoxigenina, biotina, fluoresceína, así como teofilina. De esta manera, se ha encontrado además que el cambio del residuo aminoácido en la posición VH52b/VH53 según la numeración de Kabat, el cual se encuentra dentro de la RDC2 de cadena pesada del anticuerpo, por cisteína, resulta aplicable a otros anticuerpos (anti-hapteno), sin necesidad adicional de diseño estructural o conocimiento de las estructuras de anticuerpo específicas, y sin interferencia en las propiedades de unión inherentes a los dominios variables del anticuerpo.

Los anticuerpos modificados tal como se informa en la presente memoria conservan la capacidad de unión a hapteno (antígeno) de sus contrapartidas de anticuerpo parental (es decir, de tipo salvaje). De esta manera, el anticuerpo modificado es capaz de unirse, en una realización es capaz de unión específica, a haptenos (antígenos).

La expresión "especificidad de unión" o "un anticuerpo que se une a" se refiere a que la molécula que comprende la especificidad de unión o un anticuerpo puede formar un complejo con una molécula adicional de una manera específica. La unión puede detectarse en un ensayo in vitro, tal como la técnica de resonancia del plasmón superficial (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la formación de complejo está definida por los términos  $k_a$  (constante de velocidad para la asociación de los compuestos para formar el complejo),  $k_D$  (constante de disociación, disociación del complejo) y  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ). La unión o la unión específica se refiere a una afinidad de unión ( $K_D$ ) de aproximadamente  $10^{-8}$  M o inferior; en una realización, de entre aproximadamente  $10^{-8}$  M y aproximadamente  $10^{-13}$  M; en una realización de entre aproximadamente  $10^{-9}$  M y aproximadamente  $10^{-13}$  M. De esta manera, un anticuerpo que se une a un hapteno para formar un complejo tal como se informa en la presente memoria se une específicamente al hapteno con una afinidad de unión ( $K_D$ ) de aproximadamente  $10^{-8}$  moles/l o menos; en una realización, de entre aproximadamente  $10^{-8}$  moles/l y aproximadamente  $10^{-13}$  moles/l; en una realización, de entre aproximadamente  $10^{-9}$  moles/l y  $10^{-13}$  moles/l.

Se ha encontrado que la formación de un enlace covalente entre un anticuerpo con modificación de cisteínas y un conjugado hapteno-polipéptido con modificación de cisteínas que porta el residuo cisteína en el conector entre el hapteno y el polipéptido tiene lugar con la unión del anticuerpo al hapteno sin necesidad de la adición de agentes reductores y/o oxidantes en el caso de que el enlace formado sea un enlace disulfuro. De esta manera, el puente disulfuro entre los dos compuestos se forma espontáneamente con la formación del complejo no covalente. Por lo tanto, un método para la formación de un complejo covalente tal como se informa en la presente memoria simplemente requiere la mezcla de los dos compuestos. El único prerrequisito para la formación del enlace disulfuro es una orientación correcta de los dos compuestos uno respecto a otro.

Los anticuerpos manipulados tal como se informa en la presente memoria pueden acoplarse con especificidad de sitio y de manera eficiente con un hapteno que comprende un grupo reactivo.

La sustitución del residuo aminoácido en la posición VH52b y VH53, respectivamente (según el esquema de numeración de Kabat) con un residuo de Cys resulta en derivados de anticuerpo con secuencias de región variable de cadena pesada que están listados en SEC ID n° 20 y n° 28 para el anticuerpo anti-digoxigenina-VH52bC, en SEC



ID nº 84 y nº 92 para el anticuerpo anti-teofilina-VH53C, en SEC ID nº 52 y nº 60 para el anticuerpo anti-biotina-VH53C, en SEC ID nº 108 para el anticuerpo anti-fluoresceína-VH52bC.

5 La sustitución del residuo aminoácido del dominio variable de cadena pesada en la posición VH28 (según el esquema de numeración de Kabat) con un residuo de Cys resulta en derivados de anticuerpo con secuencias de región variable de cadena pesada que están listados en SEC ID nº 116, nº 124, nº 132, nº 140, nº 148, nº 156 y nº 164, respectivamente.

10 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-digoxigenina que es un anticuerpo humanizado.

15 En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-digoxigenina que comprende por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis RDC seleccionados de entre (a) un RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 09 o nº 25, (b) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 o nº 26, (c) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11 o nº 27, (d) una RDC1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 13 o nº 29, (e) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 14 o nº 30, y (f) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 15 ó 31.

20 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-biotina que es un anticuerpo humanizado.

25 En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-biotina que comprende por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis RDC seleccionadas de entre (a) un RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 41 o nº 57, (b) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 42 o nº 58, (c) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 43 o nº 59, (d) una RDC1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 45 o nº 61, (e) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46 o nº 62, y (f) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47 ó 64.

30 En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-fluoresceína que comprende por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis RDC seleccionadas de entre (a) una RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 105 o nº 113, (b) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 106 o nº 114, (c) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 107 o nº 115, (d) una RDC1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 109 o nº 117, (e) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 110 o nº 118, y (f) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 111 ó 119.

35 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-teofilina. En un realización, el anticuerpo anti-teofilina es un anticuerpo humanizado.

40 En la presente memoria se proporciona un anticuerpo anti-teofilina que comprende por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis RDC seleccionadas de entre (a) una RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 73 o nº 89, (b) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 74 o nº 90, (c) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 75 o nº 91, (d) una RDC1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 77 o nº 93, (e) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 78 o nº 94, y (f) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 79 ó 95.

50 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-digoxigenina que comprende (a) un dominio VH que comprende por lo menos uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RHV de VH seleccionadas de entre (i) una RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 09 o nº 25, (ii) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10 o nº 26, e (iii) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11 o nº 27, y (b) un dominio VL que comprende por lo menos uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RDC de VL seleccionadas de entre (i) una RDC de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 13 o nº 29, (ii) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 14 o nº 30, y (c) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 15 ó 31.

60 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-biotina que comprende (a) un dominio VH que comprende por lo menos uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RDC de VH seleccionadas de entre (i) una RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 41 o nº 57, (ii) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 42 o nº 58, e (iii) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 43 o nº 59, y (b) un dominio VL que comprende por lo menos uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RDC de VL seleccionadas de entre (i) una RDC de cadena ligera que

comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 45 o nº 61, (ii) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 46 o nº 6242, y (c) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 47 ó 63.

5 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-fluoresceína que comprende (a) un dominio VH que comprende por lo menos uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RDC de VH seleccionadas de entre (i) una RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 105 o nº 113, (ii) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 106 o nº 114, e (iii) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 107 o nº 115, y (b) un dominio VL que comprende  
10 por lo menos uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RDC de VL seleccionadas de entre (i) una RDC de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 109 o nº 117, (ii) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 110 o nº 118, y (c) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 111 ó 119.

15 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-teofilina que comprende (a) un dominio VH que comprende por lo menos uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RDC de VH seleccionadas de entre (i) una RDC1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 73 o nº 89, (ii) una RDC2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 74 o nº 90, e (iii) una RDC3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 75 o nº 91, y (b) un dominio VL que comprende por lo menos  
20 uno, por lo menos dos o la totalidad de las tres RDC de VL seleccionadas de entre (i) una RDC de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 77 o nº 93, (ii) una RDC2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 78 o nº 94, y (c) una RDC3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 79 ó 95.

25 En cualquiera de los anteriormente indicados, el anticuerpo anti-digoxigenina, y/o el anticuerpo anti-biotina y/o el anticuerpo anti-teofilina anteriormente indicados ha sido humanizado.

En una realización, el anticuerpo anti-digoxigenina comprende una RDC tal como en cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas y comprende además un marco aceptor humano, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.  
30

En una realización, el anticuerpo anti-biotina comprende una RDC tal como en cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas y comprende además un marco aceptor humano, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.  
35

En una realización, el anticuerpo anti-teofilina comprende una RDC tal como en cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas y comprende además un marco aceptor humano, por ejemplo un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano.

40 En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-digoxigenina que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 04 o nº 12 o nº 20 o nº 28. En determinadas realizaciones, una secuencia de VH que presenta una identidad de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones (por ejemplo sustituciones conservadoras),  
45 inserciones o deleciones respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-digoxigenina que comprende dicha secuencia conserva la capacidad de unirse a digoxigenina. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC ID nº 01 o nº 09 o nº 17 o nº 25. En determinadas realizaciones, se producen sustituciones, inserciones o deleciones en regiones fuera de las RDC (es decir, en las RM). Opcionalmente, el anticuerpo anti-digoxigenina comprende la secuencia VH en SEC ID nº 01 o nº 09 o nº 17 o  
50 nº 25, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dicha secuencia.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-digoxigenina que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 08 o nº 16 o nº 24 o nº 32. En determinadas realizaciones, una secuencia de VL que presenta una identidad de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones (por ejemplo sustituciones conservadoras),  
55 inserciones o deleciones respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-digoxigenina que comprende dicha secuencia conserva la capacidad de unirse a digoxigenina. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC ID nº 08 o nº 16 o nº 24 o nº 32. En determinadas realizaciones, se producen sustituciones, inserciones o deleciones en regiones fuera de las RDC (es decir, en las RM). Opcionalmente, el anticuerpo anti-digoxigenina comprende la secuencia VL en SEC ID nº 08 o nº 16 o nº 24 o  
60 nº 32, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dicha secuencia.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-biotina que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 36 o nº 44 o nº 52 o nº 60. En determinadas realizaciones, una secuencia de VH que presenta una identidad de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones (por ejemplo sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-biotina que comprende dicha secuencia conserva la capacidad de unirse a biotina. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC ID nº 36 o nº 44 o nº 52 o nº 60. En determinadas realizaciones, se producen sustituciones, inserciones o deleciones en regiones fuera de las RDC (es decir, en las RM). Opcionalmente, el anticuerpo anti-biotina comprende la secuencia VH en SEC ID nº 36 o nº 44 o nº 52 o nº 60, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dicha secuencia.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-fluoresceína que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 108 o nº 116. En determinadas realizaciones, una secuencia de VH que presenta una identidad de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones (por ejemplo sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-fluoresceína que comprende dicha secuencia conserva la capacidad de unirse a fluoresceína. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC ID nº 108 o nº 116. En determinadas realizaciones, se producen sustituciones, inserciones o deleciones en regiones fuera de las RDC (es decir, en las RM). Opcionalmente, el anticuerpo anti-fluoresceína comprende la secuencia VH en SEC ID nº 108 o nº 116, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dicha secuencia.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-teofilina que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 68 o nº 76 o nº 84 o nº 92. En determinadas realizaciones, una secuencia de VH que presenta una identidad de por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% contiene sustituciones (por ejemplo sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-teofilina que comprende dicha secuencia conserva la capacidad de unirse a teofilina. En determinadas realizaciones, se ha sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEC ID nº 68 o nº 76 o nº 84 o nº 92. En determinadas realizaciones, se producen sustituciones, inserciones o deleciones en regiones fuera de las RDC (es decir, en las RM). Opcionalmente, el anticuerpo anti-teofilina comprende la secuencia VH en SEC ID nº 68 o nº 76 o nº 84 o nº 92, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dicha secuencia.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-digoxigenina, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente y un VL tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEC ID nº 04 o nº 12 o nº 20 o nº 28, y SEC ID nº 08 o nº 16 o nº 24 o nº 32, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dichas secuencias.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-biotina, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente y un VL tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEC ID nº 36 o nº 44 o nº 52 o nº 60, y SEC ID nº 40 o nº 48 o nº 56 o nº 64, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dichas secuencias.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-fluoresceína, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente y un VL tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEC ID nº 108 o nº 116, y la SEC ID nº 112 o nº 120, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dichas secuencias.

En la presente memoria se informa de un anticuerpo anti-teofilina, en el que el anticuerpo comprende un VH tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente y un VL tal como en cualquiera de los aspectos y/o realizaciones proporcionados anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEC ID nº 68 o nº 76 o nº 84 o nº 92, y SEC ID nº 72 o nº 80 o nº 88 o nº 96, respectivamente, incluyendo modificaciones post-traduccionales de dichas secuencias.

Una posición adicional que ha sido identificada como punto de modificación es la posición VH28 según la numeración de Kabat.

La sustitución del aminoácido en la posición VH28 según Kabat por Cys genera derivados de anticuerpo con secuencias de región variable de cadena pesada que se listan como SEC ID nº 124 y nº 132 para el anticuerpo anti-digoxigenina-VH28, en SEC ID nº 156 y nº 164 para el anticuerpo anti-teofilina-VH28C, en SEC ID nº 140 y nº 148 para el anticuerpo anti-biotina-VH28C, y SEC ID nº 116 para el anticuerpo anti-fluoresceína-VH28C.

5 Los análisis de IEP-EM demuestran que la conjugación de anticuerpos covalente de péptidos terapéuticos haptenilados resulta en un conjugado de tamaño definido que es mayor que el del anticuerpo no acoplado o que el del péptido no acomplejado.

10 Tabla 1: tabla TIC.

muestra	Notas	CL PM <sub>calc.</sub>	CL PM <sub>exp.</sub>	CP PM <sub>calc.</sub>	CP PM <sub>exp.</sub>	PM <sub>calc.</sub> de conjugado	PM <sub>exp.</sub> de conjugado
anticuerpo humanizado anti-digoxigenina	1); 2); 3)	23371	23371	49635	49634	n.a.	n.a.
anticuerpo humanizado anti-digoxigenina-VH52bC	1); 2); 3)	23371	23371	49681	49680	n.a.	n.a.
Ac-PYY[PEG3-Cys(SS-R)-4Abu-Dig] R= anticuerpo anti-digoxigenina humanizado VH52bC	1); 2); 3)	23371	23371	49681	49680	152227	152233
anticuerpo quimérico anti-biotina	2); 3)	23429	23429	49312	49311	n.a.	n.a.
anticuerpo quimérico anti-biotina VH53C	2); 3)	23429	23429	49344	49343	n.a.	n.a.
anticuerpo humanizado anti-biotina	1); 2); 3)	23465	23464	49218	49217	n.a.	n.a.
anticuerpo humanizado VH53C anti-biotina	1); 2); 3)	23465	23465	49250	49250	n.a.	n.a.
Ac-PYY[PEG3-Cys(SS-R)-βAla-Biot R= anticuerpo quimérico anti-biotina VH53C	2); 3)	23429	23429	49344	49344	151233	151238
Ac-PYY[PEG3-Cys(SS-R)-PEG2-Biot R= anticuerpo quimérico anti-biotina VH53C	2); 3)	23429	23429	49344	49344	151381	151385
Ac-PYY[PEG3-Cys(SS-R)-βAla-Biot R= anticuerpo humanizado anti-biotina VH53C	1); 2); 3)	23465	23465	49250	49250	151118	151124
Ac-PYY[PEG3-Cys(SS-R)-PEG2-Biot R= anticuerpo humanizado anti-biotina VH53C	1); 2); 3)	23465	23465	49250	49250	151266	151272
anticuerpo anti-fluoresceína	2); 3)	23958	23958	49150	49149	n.a.	n.a.
anticuerpo anti-fluoresceína VH52bC	2); 3)	23958	23957	49124	49124	n.a.	n.a.
anticuerpo anti-fluoresceína VH28C	2); 3)	23958	23957	49152	49151	n.a.	n.a.
Ac-PYY[PEG3-Cys(SS-R)-PEG2-Fluo R=anticuerpo anti-fluoresceína VH52bC	2); 3)	23958	23957	49124	49125	152271	152265
1) CP con ácido piroglutámico N-terminal 2) CP sin Lys C-terminal 3) CP con N -> D en el sitio de glucosilación debido a la desglucosilación 4) CL con ácido piroglutámico N-terminal							

#### Afinidad de anticuerpos

15 En determinadas realizaciones, el anticuerpo tal como se informa en la presente memoria misma o el anticuerpo en el complejo tal como se informa en la presente memoria presenta una constante de disociación ( $K_d$ )  $\leq 10$  nM,  $\leq 1$  nM,  $\leq 0,1$  nM,  $\leq 0,01$  nM o  $\leq 0,001$  nM (por ejemplo de aproximadamente  $10^{-8}$  M o inferior, por ejemplo de entre aproximadamente  $10^{-8}$  M y  $10^{-13}$  M, por ejemplo de entre aproximadamente  $10^{-9}$  M y aproximadamente  $10^{-13}$  M).

20 En una realización,  $K_d$  se mide mediante un ensayo de unión a antígeno marcado con radioactivamente (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se indica en el ensayo siguiente. La afinidad de unión en solución de los Fab para el antígeno mediante el equilibrado de Fab con una concentración

mínima de antígeno marcado con  $^{125}\text{I}$  en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, capturando seguidamente el antígeno unido con una placa recubierta con antígeno anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen Y. et al., J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999). Para establecer condiciones para el ensayo, se recubrieron placas multipocillo MICROTITER<sup>®</sup> (ThermoScientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc n° 269620), se mezclaron antígeno- $^{125}\text{I}$  100 ó 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo consistente con la evaluación del anticuerpo anti-FCEV, Fab-12, en Presta L.G. et al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). A continuación, se incubó el Fab de interés durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más prolongado (por ejemplo aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. A continuación, se transfirieron las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo durante una hora). A continuación se retiró la solución y la placa se lavó ocho veces con polisorbato-20 al 0,1% (Tween-20<sup>®</sup>) en PBS. Tras secarse las placas, se añadieron 150 µl/pocillo de líquido de centelleo (Microscint-20<sup>™</sup>, Packard) y las placas se contaron en un contador gamma Topcount<sup>™</sup> (Packard) durante diez minutos. Para la utilización en ensayos de unión competitiva se seleccionaron concentraciones de cada Fab que proporcionaban una unión máxima inferior o igual a 20%.

Según otra realización, se midió la  $K_d$  mediante ensayos de resonancia del plasmón superficial utilizando un BIACORE<sup>®</sup>-2000 ó BIACORE<sup>®</sup>-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 con antígeno inmovilizado a razón de ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activaron chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se diluyó el antígeno con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (aproximadamente 0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto, alcanzando aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyectó etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con surfactante de polisorbato-20 al 0,05% (TWEEN-20<sup>™</sup>) (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calcularon las tasas de asociación ( $k_{on}$ ) y de disociación ( $k_{off}$ ) utilizando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno (software de evaluación de BIACORE<sup>®</sup> versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación ( $K_d$ ) se calculó como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ . Ver, por ejemplo, Chen Y et al., J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999. En el caso de que la tasa 'on' exceda  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  según el ensayo de resonancia de plasmón superficial indicado anteriormente, la tasa 'on' puede determinarse mediante la utilización de una técnica de inhibición de fluorescencia que mida el incremento o reducción de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación a 295 nm, emisión a 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (formato Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro dotado de un sistema de interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO<sup>™</sup> de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitador.

#### Fragmentos de anticuerpo

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria o en un conjugado tal como se informa en la presente memoria es un fragmento de anticuerpo. Entre los fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos indicados posteriormente. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, ver Hudson P.J. et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003. Para una revisión de los fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plueckthun, en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), Springer-Verlag, New York (1994), 269 a 315; ver también la patente WO n° 93/16185, y las patentes US n° 5.571.894 y n° 5.587.458. Para un comentario de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítipo ligante de receptor de reciclaje y que presenta una semivida incrementada, ver la patente US n° 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, la patente EP n° 0 404 097 y el documento n° WO 1993/01161; Hudson P.J. et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003, y Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se encuentran descritos en Hudson P.J. et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de único dominio es un anticuerpo de único dominio humano (Domantis Inc., Waltham M.A.; ver, por ejemplo, la patente US n° 6.248.516).

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, aunque sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por parte de células huésped recombinantes (por ejemplo *E. coli* o fagos), tal como se indica en la presente memoria.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria o el anticuerpo en un conjugado tal como se informa en la presente memoria es un fragmento quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen en, por ejemplo, la patente US nº 4.816.567 y en Morrison S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "de clase intercambiada" en el que la clase o subclase ha sido modificada respecto a la del anticuerpo parental. Entre los anticuerpos quiméricos se incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

15 En determinadas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad para el ser humano, reteniendo simultáneamente la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano parental.

20 Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las R<sub>HV</sub>, por ejemplo las R<sub>DC</sub> (o partes de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano, y las R<sub>M</sub> (o partes de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente comprende además por lo menos una parte de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo el anticuerpo del que se derivan los residuos de R<sub>HV</sub>), por ejemplo para restaurar o mejorar la especificidad o la afinidad del anticuerpo.

25 Los anticuerpos humanizados y métodos de preparación de los mismos se revisan en, por ejemplo, Almagro J.C. y Fransson J., Front. Biosci. 13:1619-1633, 2008, y se describen adicionalmente en, por ejemplo, Riechmann et al., Nature 332:323-329, 1988; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989; patentes US nº 5.821.337, nº 7.527.791, nº 6.982.321 y nº 7.087.409; Kashmiri S.V. et al., Methods 36:25-34, 2005 (que describe la injertación de SDR (a-R<sub>DC</sub>)); Padlan E.A., Mol. Immunol. 28:489-498, 1991 (que describe la "resuperficialización"); Dall'Acqua W.F. et al., Methods 36:43-60, 2005 (que describe la "reorganizaciónn de R<sub>M</sub>"), y Osbourn J. et al., Methods 36:61-68, 2005, y Klimka A. et al., Br. J. Cancer 83:252-260, 2000 (que describe el enfoque de "selección guiada" a la reorganización de R<sub>M</sub>).

35 Entre las regiones marco humanas que pueden utilizarse para la humanización se incluyen, aunque sin limitación: regiones marco seleccionadas utilizando el método "de ajuste óptimo" (ver, por ejemplo, Sims M.J. et al., J. Immunol. 151:2296-2308, 1993; regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (ver, por ejemplo, Carter P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289, 1992, y Presta L.G. et al., J. Immunol. 151:2623-2632, 1993); regiones marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones de marco de línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro J.C. y Fransson J., Front. Biosci. 13:1619-1633, 2008), y regiones marco derivadas del cribado de bibliotecas de R<sub>M</sub> (ver, por ejemplo, Baca M. et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684, 1997, y Rosok M.J. et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618, 1996).

Anticuerpos humanos

45 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria o el anticuerpo en un conjugado tal como se informa en la presente memoria es un anticuerpo humano. Pueden producirse anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas. Se describen de manera general anticuerpos humanos en van Dijk M.A. y van de Winkel J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-784, 2001, y Lonberg N., Curr. Opin. Immunol. 20:450-459, 2008.

55 Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la administración de un inmunógeno en un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al reto antigénico. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o una parte de los loci de inmunoglobulina humanos, que sustituyen los loci de inmunoglobulina endógenos, o que se encuentran presentes extracromosómicamente o se integran aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógenos han sido generalmente inactivados. Para una revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, ver Lonberg N., Nat. Biotech. 23:1117-1125, 2005. Ver también, por ejemplo, las patentes US nº 6.075.181 y nº 6.150.584 describen la tecnología XENOMOUSE<sup>TM</sup>, la patente US nº 5.770.429 describe la tecnología HUMAB®, la patente US nº 7.041.870 describe la tecnología K-M MOUSE®, y el documento nº US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Pueden modificarse adicionalmente regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales, por ejemplo mediante la combinación con una región constante humana diferente.

60

También pueden prepararse anticuerpos humanos mediante métodos basados en hibridomas. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos ya han sido descritas (ver, por ejemplo, Kozbor D., *J. Immunol.* 133:3001-3005, 1984; Brodeur B.R. et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, páginas 51 a 63, y Boerner P. et al., *J. Immunol.* 147:86-95, 1991). Los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridomas de células B humanas también se describen en Li J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:3557-3562, 2006. Entre los métodos adicionales se incluyen los indicados en, por ejemplo, la patente US nº 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni J., *Xiandai Mianyixue* 26:265-268, 2006 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de triomas) también se describe en Vollmers H.P. y Brandlein S., *Histology and Histopathology* 20:927-937, 2005, y Vollmers H.P. y Brandlein S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27:185-191, 2005.

También pueden generarse anticuerpos humanos mediante el aislamiento de secuencias de dominio variable de clon Fv a partir de bibliotecas de expresión fágica de origen humano. Dichas secuencias de dominio variable seguidamente pueden combinarse con un dominio constante humano deseado.

Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos se describen posteriormente.

#### Anticuerpos derivados de biblioteca

Pueden aislarse anticuerpos tal como se informa en la presente memoria o anticuerpos en el conjugado tal como se informa en la presente memoria mediante el cribado de bibliotecas combinatoriales para anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una diversidad de métodos son conocidos de la técnica para la generación de bibliotecas de expresión fágica y el cribado de dichas bibliotecas para anticuerpos que presenten las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan en, por ejemplo, Hoogenboom H.R. et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, 2001, y que se describen adicionalmente en, por ejemplo, McCafferty J. et al., *Nature* 348:552-554, 1990; Clackson T. et al., *Nature* 352:624-628, 1991; Marks J.D. et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1992; Marks J.D. y Bradbury A., *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, 2003; Sidhu S.S. et al., *J. Mol. Biol.* 338:299-310, 2004; Lee C.V. et al., *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093, 2004; Fellouse F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:12467-12472, 2004; y Lee C.V. et al., *J. Immunol. Methods* 284:119-132, 2004.

En determinados métodos de expresión fágica, se clonan separadamente repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas fágicas, que seguidamente pueden cribarse para fago ligante de antígeno tal como se describe en Winter G. et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994. Los fagos típicamente expresan fragmentos de anticuerpos, en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, puede clonarse el repertorio no expuesto (por ejemplo a partir de un ser humano) con el fin de proporcionar una única fuente de anticuerpos contra un amplio abanico de no autoantígeno y también autoantígenos sin ninguna inmunización, tal como describen Griffiths A.D. et al., *EMBO J.* 12:725-734, 1993. Finalmente, también pueden prepararse sintéticamente bibliotecas no expuestas mediante clonación de segmentos de gen V no reorganizado a partir de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones RDC3 altamente variables y para llevar a cabo la reorganización in vitro, tal como describen Hoogenboom H.R. y Winter G., *J. Mol. Biol.* 227:381-388, 1992. Entre las publicaciones de patente que describen bibliotecas fágicas de anticuerpos humanos se incluyen, por ejemplo: la patente US nº 5.750.373 y las publicaciones de patente US nº 2005/0079574, nº 2005/0119455, nº 2005/0266000, nº 2007/0117126, nº 2007/0160598, nº 2007/0237764, nº 2007/0292936 y nº 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en la presente memoria.

#### Formatos de anticuerpo

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo anteriormente indicados de manera general pueden combinarse de múltiples maneras para generar diferentes formatos de anticuerpo.

Por ejemplo, puede fusionarse uno o más fragmentos scFv de anticuerpo con el extremo C-terminal de una o más cadenas polipeptídicas de un anticuerpo completo. Especialmente con el extremo C-terminal de cada cadena pesada o con el extremo C-terminal de cada cadena ligera puede fusionarse un fragmento scFv de anticuerpo.

Por ejemplo, puede fusionarse uno o más fragmentos Fab de anticuerpo con el extremo C-terminal de una o más cadenas polipeptídicas de un anticuerpo completo. Especialmente con el extremo C-terminal de cada cadena pesada o con el extremo C-terminal de cada cadena ligera puede fusionarse un fragmento Fab de anticuerpo.

- 5 Por ejemplo, pueden fusionarse un scFv y un fragmento Fab de anticuerpo con los extremos N-terminales de una región Fc de anticuerpo.

10 Por ejemplo, pueden fusionarse un scFv o fragmento Fab de anticuerpo con el extremo N-terminal de una región Fc de anticuerpo y un scFv o fragmento Fab de anticuerpo pueden fusionarse con el extremo C-terminal de la otra cadena respectiva de una región Fc de anticuerpo.

#### Anticuerpos multiespecíficos

15 Una amplia diversidad de formatos de anticuerpo recombinante ha sido desarrollada, por ejemplo anticuerpos biespecíficos tetravalentes mediante la fusión de, por ejemplo, un formato de anticuerpo IgG y dominios de cadena sencilla (ver, por ejemplo, Coloma M.J. et al., *Nature Biotech.* 15:159-163, 1997, documento nº WO 2001/077342, y Morrison S.L., *Nature Biotech.* 25:1233-1234, 2007).

20 Además, se han desarrollado varios otros formatos nuevos en los que ya no se retiene la estructura nuclear del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, minicuerpos, varios formatos de cadena sencilla (scFv, Bis-scFv), que son capaces de unirse a dos o más antígenos (Holliger P. et al., *Nature Biotech.* 23:1126-1136, 2005; Fischer N. y Léger O., *Pathobiology* 74:3-14, 2007; Shen J. et al., *Journal of Immunological Methods* 318:65-74, 2007; Wu C. et al., *Nature Biotech.* 25:1290-1297, 2007).

25 La totalidad de dichos formatos utiliza conectores para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) a una proteína ligante adicional (por ejemplo scFv) o para fusionar, por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv (Fischer N. y Léger O., *Pathobiology* 74:3-14, 2007). Debe considerarse que uno puede desear la conservación de las funciones efectoras, tales como, por ejemplo, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), las cuales se encuentran mediadas por la unión de un receptor Fc, mediante el mantenimiento de un grado elevado de similitud con los anticuerpos naturales.

35 En el documento nº WO 2007/024715 se informa de inmunoglobulinas duales de dominio variable en forma de proteínas construidas ligantes multivalentes y multiespecíficas. Se informa de un procedimiento para la preparación de anticuerpos diméricos biológicamente activos en la patente US nº 6.897.044. Se informa de un constructo de anticuerpo Fv multivalente que presenta por lo menos cuatro dominios variables que se encuentran unidos entre sí mediante conectores peptídicos en la patente US nº 7.129.330. Se informa de estructuras de unión de antígeno diméricas y multiméricas en el documento nº US 2005/0079170. En la patente US nº 6.511.663 se informa de una proteína anterior de unión antígeno mono-específica tetravalente que comprende tres o cuatro fragmentos Fab unidos entre sí covalentemente mediante una estructura de conexión, no siendo esta proteína una inmunoglobulina natural. En el documento WO nº 2006/020258 se informa de anticuerpos biespecíficos tetravalentes que pueden expresarse eficientemente en células procarióticas y eucarióticas, y que resultan útiles en métodos terapéuticos y diagnósticos. Se informa en el documento US nº 2005/0163782 de un método para la separación o la síntesis preferente de dímeros unidos mediante por lo menos un enlace disulfuro entre cadenas, a partir de dímeros que no se encuentran unidos por, como mínimo, un enlace disulfuro entre cadenas, en el que se parte de una mezcla que comprende los dos tipos de polipéptidos diméricos. Se informa de receptores tetravalentes biespecíficos en la patente US nº 5.959.083. Se informa de anticuerpos construidos con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales en el documento WO nº 2001/077342.

45 Se informa de polipéptidos de unión a antígeno multiespecíficos y multivalentes en el documento nº WO 1997/001580. El documento nº WO 1992/004053 informa de homoconjugados, típicamente preparados a partir de anticuerpos monoclonales de la clase IgG que se unen al mismo determinante antigénico, unidos covalentemente mediante entrecruzamiento sintético. Se informa de anticuerpos monoclonales oligoméricos con elevada avidéz para antígenos en el documento nº WO 1991/06305, en la que se secretan oligómeros, típicamente de la clase IgG, que presentan dos o más monómeros inmunoglobulina asociados entre sí formando moléculas de IgG tetravalentes o hexavalentes. Se informa de anticuerpos derivados de ovejas y constructos de anticuerpo manipulados en la patente US nº 6.350.860, que pueden utilizarse para tratar enfermedades en las que la actividad del interferón gamma resulta patogénica. En el documento nº US 2005/0100543 se informa de constructos dirigibles que son portadores multivalentes de anticuerpos biespecíficos, es decir, cada molécula de un constructo dianizable puede servir como portador de dos o más anticuerpos biespecíficos. Se informa de anticuerpos tetravalentes biespecíficos genéticamente manipulados en el documento nº WO 1995/009917. En el documento nº WO 2007/109254 se informa de moléculas de unión estabilizadas que consisten o que comprenden un scFv estabilizado.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria o el anticuerpo en un



conjugado tal como se informa en la presente memoria es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que presentan especificidades de unión para por lo menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para un hapteno y la otra es para cualquier otro antígeno (no hapteno). También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos en forma de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Entre las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos se incluyen, aunque sin limitación, la coexpresión recombinante de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que presentan especificidades diferentes (ver Milstein C. y Cuello A.C., *Nature* 305:537-540, 1983, el documento nº WO 93/08829, y Traunecker A. et al., *EMBO J.* 10:3655-3659, 1991) y las construcciones de "botón-en-ojal" (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.731.168). También pueden prepararse anticuerpos multiespecíficos mediante la manipulación de efectos de orientación electrostática para la preparación de moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento nº WO 2009/089004), el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.676.980, y Brennan M. et al., *Science* 229:81-83, 1985), la utilización de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny S.A. et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553, 1992), la utilización de la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos (ver, por ejemplo, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993) y la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv) (ver, por ejemplo, Gruber M. et al., *J. Immunol.* 152:5368-5374, 1994) y la preparación de anticuerpos trispecíficos tal como se describe en, por ejemplo, Tutt A. et al., *J. Immunol.* 147:60-69, 1991.

En una realización, los dominios CH3 de las cadenas pesadas del anticuerpo biespecífico se alteran mediante la tecnología de "botón en ojal", que se describe en detalle mediante varios ejemplos en, por ejemplo, los documentos nº WO 96/027011 y nº WO 98/050431, Ridgway J.B. et al., *Protein Eng.* 9:617-621, 1996, y en Merchant A.M. et al., *Nat. Biotechnol.* 16:677-681, 1998. En dicho método, se alteran las superficies de interacción de los dos dominios CH3 para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen dichos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza los heterodímeros (Merchant A.M. et al., *Nature Biotech.* 16:677-681, 1998; Atwell S. et al., *J. Mol. Biol.* 270:26-35, 1997) e incrementa el rendimiento.

En una realización de todos los aspectos, el anticuerpo biespecífico se caracteriza porque:

- el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de la otra cadena pesada se reúnen en una interfaz que comprende una interfaz original entre los dominios CH3 del anticuerpo,

en donde se altera dicha interfaz con el fin de estimular la formación del anticuerpo biespecífico, en el que la alteración se caracteriza porque:

- a) se altera el dominio CH3 de una cadena pesada, de manera que dentro de la interfaz original el dominio CH3 de una cadena pesada que se reúne con la interfaz original del dominio CH3 de la otra cadena pesada en el anticuerpo biespecífico, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de una cadena pesada que es posicionable en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada, y

- b) se altera el dominio CH3 de la otra cadena pesada,

de manera que dentro de la interfaz original del segundo dominio CH3 que se reúne con la interfaz original del primer dominio CH3 en el anticuerpo biespecífico, se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más pequeño, generando de esta manera una cavidad en la interfaz del segundo dominio CH3 dentro de la cual puede posicionarse una protuberancia en la interfaz del primer dominio CH3.

De esta manera, los anticuerpos tal como se informan en la presente memoria se caracterizan en una realización porque:

- el dominio CH3 de la primera cadena pesada del anticuerpo de longitud completa y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada del anticuerpo de longitud completa se reúnen en una interfaz que comprende una alteración de la interfaz original entre los dominios CH3 de anticuerpo,

en donde i) en el dominio CH3 de la primera cadena pesada se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral mayor, generando de esta manera una protuberancia dentro de la interfaz del dominio CH3 de la cadena pesada que es posicionable en una cavidad dentro de la interfaz del dominio CH3 de la otra cadena pesada

y en donde ii) en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral menor, generando de esta manera una cavidad dentro del segundo dominio CH3 dentro de la que puede posicionarse una protuberancia dentro de la interfaz del primer dominio CH3.

5 En una realización, el residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de entre el grupo que consiste de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

10 En una realización, el residuo aminoácido que presenta un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de entre el grupo que consiste de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

15 En una realización, ambos dominios CH3 se han alterado adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3, de manera que puede formarse un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

20 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botón", y las mutaciones T366S, L368A y Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal". También puede utilizarse un puente disulfuro adicional entre cadenas entre los dominios CH3 (Merchant A.M. et al., Nature Biotech. 16:677-681, 1998), por ejemplo mediante la introducción de una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena de botón" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración según el índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

25 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A y Y407V en el otro de los dos dominios CH3. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación E356C o S354C adicional en el otro dominio CH3 forman un puente disulfuro entre cadenas) (numeración según el índice EU de Kabat (Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)). Aunque también pueden utilizarse alternativa o adicionalmente otras tecnologías de botón-en-oyal, tal como se indica en el documento nº EP 1 870 459 A1. De esta manera, otro ejemplo de anticuerpo biespecífico son las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración según el índice EU de Kabat (Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)).

35 En una realización, el anticuerpo biespecífico trivalente comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal", y además las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botón", y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal".

40 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o el anticuerpo biespecífico comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3, y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, y además las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botón" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal". Dichas mutaciones de botón y ojal en el dominio CH3 se utilizan típicamente en las regiones constantes de cadena pesada humana de SEC ID nº 169, SEC ID nº 170, SEC ID nº 171 ó SEC ID nº 172 (alotipos de la subclase IgG1 humana (caucásica y afroamericana o mutantes L234A/L235A y L234A/L235A/P329G), SEC ID nº 173, SEC ID nº 174 ó SEC ID nº 175 (subclase IgG4 humana o mutantes S228P, L235E y S228P/L235E/P329G) (numeración según el índice EU de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)).

45 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende regiones constantes de cadena pesada humana de SEC ID nº 169, SEC ID nº 170, SEC ID nº 171 ó SEC ID nº 172, SEC ID nº 173, SEC ID nº 174 ó SEC ID nº 175, que incluye además dichas mutaciones "de botón" y "de ojal" en el dominio CH3 (por ejemplo las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3) (numeración según el índice EU de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

50 Los anticuerpos manipulados con tres o más sitios de unión de antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos Octopus" también se encuentran incluidos en la presente memoria (ver, por ejemplo, el documento nº US 2006/0025576).

55

60

El anticuerpo o fragmento en la presente memoria también incluye un “Fab de doble acción” o “FDA”, que comprende un sitio de unión a hapteno, así como a otro antígeno diferente (ver el documento nº US 2008/0069820, por ejemplo).

5 El anticuerpo o fragmento en la presente memoria también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO nº 2009/080251, nº 2009/080252, nº 2009/080254, nº 2009/080253, nº 2010/112193, nº 2010/115589, nº 2010/136172, nº 2010/145792 y nº 2010/145793.

10 En una realización, la primera especificidad de unión del anticuerpo específico es a un hapteno y la segunda especificidad de unión es a un antígeno no hapteno. En una realización, el antígeno no hapteno se selecciona de entre los marcadores leucocitarios CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD11a,b,c, CD13, CD14, CD18, CD19, CD22, CD23, CD27 y su ligando, CD28 y sus ligandos B7.1, B7.2, B7.3, CD29 y su ligando, CD30 y su ligando, CD40 y su ligando gp39, CD44, CD45 e isoformas, CD56, CD58, CD69, CD72, CTLA-4, LFA-1 y TCR; los antígenos de histocompatibilidad, CMH de clase I o II, los antígenos Y de Lewis, SLex, SLey, SLea y SLeb; las integrinas, VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6,  $\alpha$ V $\beta$ 3 y LFA-1, Mac-1 y p150,95,  $\alpha$ V $\beta$ 1, gpIIb/IIIa,  $\alpha$ R  $\beta$ 3,  $\alpha$ 6 $\beta$ 4,  $\alpha$ V $\beta$  5,  $\alpha$ V $\beta$ 6 y  $\alpha$ V 62 7; las selectinas, L-selectina, P-selectina y E-selectina y sus contra-receptores VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 y LFA-3; las interleuquinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 e IL-15; el receptor de interleuquina se selecciona de entre el grupo que consiste de IL-1 R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-8R, IL-9R, IL-10R, IL-11R, IL-12R, IL-13R, IL-14R e IL-15R; la quimoquina se selecciona de entre el grupo que consiste de PF4, RANTES, MIP1 $\alpha$ , MCP1, NAP-2, Gro $\alpha$ , Gro $\beta$  e IL-8; el factor de crecimiento se selecciona de entre el grupo que consiste de FNTalpha, TGFbeta, TSH, FCEV/VPF, FCEVA, FCEVB, FCEV111, FCEV121, FCEV165, FCEV189, FCEV206, PTHrP, familia de FCE, familia de FCDP, endotelina, fibrosina (FSF-1), laminina humana y péptido liberador de gastrina (PLG), PLGF, HGH, HGHR; el receptor de factor de crecimiento se selecciona de entre el grupo que consiste de FNTalphaR, FCRbetaR, RHET, FCEV/VPFR, RFCE, PTHrPR, familia de RFCDP, EPO-R, R-FECG y otros factores hematopoyéticos; el receptor de interferón se selecciona de entre el grupo que consiste de IFNC $\alpha$ R, IFN $\beta$ R e IFN $\lambda$ R; la Ig y su receptor se selecciona de entre el grupo que consiste de IgE, Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII; el antígeno tumoral se selecciona de entre el grupo que consiste de her2-neu, mucina, ACE y endosialina; el alérgeno se selecciona de entre el grupo que consiste de antígeno de ácaro del polvo, antígenos lol p1 (hierba) y urushiol; el polipéptido vírico se selecciona de entre el grupo que consiste de las glucoproteínas del CMV B, H y gCIII, las glucoproteínas de cubierta del VIH-1, las glucoproteínas de cubierta del VSR, las glucoproteínas de cubierta del VPH, los antígenos de superficie de la familia de la hepatitis; la toxina se selecciona de entre el grupo que consiste de la endotoxina de Pseudomonas y la osteopontina/uropontina, veneno de serpiente, veneno de araña y conotoxina de veneno de abeja; el factor sanguíneo se selecciona de entre el grupo que consiste de complemento C3b, complemento C4a, complemento C4b-9, factor h, fibrinógeno, fibrina e inhibidor del crecimiento asociado a la mielina, y el enzima se selecciona de entre el grupo que consiste de polipéptido de transferencia de éster de colestserol, metaloproteasas de matriz unidas a membrana y la ácido glutámico descarboxilasa (AGD).

40 Variantes de anticuerpo

En determinadas realizaciones, se encuentran contempladas variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos codificante del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Entre dichas modificaciones se incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para conseguir el constructo final, con la condición de que el constructo final presente las características deseadas, por ejemplo de unión a antígeno.

50 a) Variantes por sustitución, inserción y deleción

En determinadas realizaciones se proporcionan variantes del anticuerpo que presentan una o más sustituciones de aminoácidos. Entre los sitios de interés de la mutagénesis por sustitución se incluyen las RHV y las FR. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribarse los productos para una actividad deseada, por ejemplo la unión conservada/mejorada a antígenos, una inmunogenicidad reducida o una ADCC o CDC mejorada.

Tabla 2.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln

Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden clasificarse según propiedades de cadena lateral comunes:

- 5
- (1) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile,
  - (2) neutros hidrofílicos: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,
  - (3) ácidos: Asp, Glu,
  - (4) básicos: His, Lys, Arg,
  - (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro,
  - (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.
- 10

Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un elemento de una de dichas clases por uno de otra clase.

- 15
- Un tipo de variante por sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el estudio adicional presentarán modificaciones (por ejemplo mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo una afinidad incrementada, una inmunogenicidad reducida) respecto al anticuerpo parental y/o presentarán determinadas propiedades biológicas conservadas del anticuerpo parental. Una variante por sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente,
- 20
- por ejemplo utilizando técnicas de maduración de la afinidad basadas en la expresión fágica, tales como las descritas en la presente memoria. Brevemente, se muta uno o más residuos de la RHV y los anticuerpos variantes se expresan sobre fagos y se criban para una actividad biológica particular (por ejemplo la afinidad de unión).

- 25
- Las alteraciones (por ejemplo las sustituciones) pueden realizarse en RHV, por ejemplo para mejorar la afinidad de un anticuerpo. Pueden introducirse dichas alteraciones en "puntos calientes" de la RHV, es decir, en residuos codificados por codones que experimentan mutación a frecuencia elevada durante el proceso de maduración somática (ver, por ejemplo, Chowdhury P.S., *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008) y/o RDE (a-RDC), sometiendo a ensayo la VH o VL variante resultante para la afinidad de unión. La maduración de la afinidad mediante la construcción y reelección a partir de bibliotecas secundarias ha sido descrita en, por ejemplo, Hoogenboom H.R. et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, 2002. En algunas realizaciones de maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para la maduración mediante cualquiera de entre una diversidad de métodos (por ejemplo la PCR con tendencia a errores, el barajado de cadenas o la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación se crea una biblioteca secundaria. Seguidamente se criba la biblioteca con el fin de identificar cualesquiera variantes de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir
- 30
- diversidad implica enfoques dirigidos a RHV, en los que se aleatorizan varios residuos de la RHV (por ejemplo 4 a 6 residuos de una vez). Los residuos de RHV que participan en la unión del antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo utilizando mutagénesis de escaneo de alaninas o el modelaje. Con frecuencia son diana la RDC3 de cadena pesada y la RDC3 de cadena ligera, en particular.

- 35
- 40
- En determinadas realizaciones, pueden producirse sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más RHV con la condición de que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden realizarse alteraciones conservadoras en la RHV (por ejemplo sustituciones conservadoras tal como las proporcionadas en la presente memoria) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden encontrarse fuera de los "puntos calientes" de las RHV o RDE. En determinadas realizaciones de las secuencias de VH y VL variante proporcionadas anteriormente, cada RHV se encuentra no
- 45

alterada o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puede ser la diana para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por escaneo de alaninas" tal como la describen Cunningham B.C. y Wells J.A., Science 244:1081-1085, 1989. En este método, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo residuos con carga, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo alanina o polialanina) con el fin de determinar si resulta afectada la interacción del anticuerpo con el antígeno. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácido, demostrando sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos pueden ser las dianas o ser eliminadas como candidatos para la sustitución. Pueden cribarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Entre las inserciones de secuencia de aminoácidos se incluyen las fusiones amino-terminales y/o carboxilo-terminales de longitud comprendida entre un residuo y polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de una secuencia de un solo residuo o múltiples residuos aminoácidos. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal. Entre otras variantes por inserción de la molécula de anticuerpo se incluyen la fusión con el extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo con un enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida sérica del anticuerpo.

#### b) Variantes por glucosilación

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria o comprendido en un conjugado tal como se informa en la presente memoria se altera para incrementar o reducir el grado con el que se glucosila el anticuerpo. La adición o delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede llevarse a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que se genere o se elimine uno o más sitios de glucosilación.

En el caso de que el anticuerpo comprenda una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por las células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que generalmente se une mediante un enlace del nitrógeno a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright A. y Morrison, S.L., TIBTECH 15:26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo manosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a GINAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en el anticuerpo de la invención con el fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que presentan una estructura de carbohidrato sin fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de entre 1 % y 80 %, de entre 1 % y 65 %, de entre 5 % y 65 % o de entre 20 % y 40 %. La cantidad de fucosa se determina mediante el cálculo de la cantidad media de fucosa dentro de la cadena sacárida en Asn297, respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa), según medición realizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en el documento n° WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar situado aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos cadena arriba o abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de la secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden presentar una función ADCC mejorada. Ver, por ejemplo, los documentos US n° 2003/0157108 y n° 2004/0093621. Entre los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" se incluyen: los documentos n° US 2003/0157108, n° WO 2000/61739, n° WO 2001/29246, n° US 2003/0115614, n° US 2002/0164328, n° US 2004/0093621, n° US 2004/0132140, n° US 2004/0110704, n° US 2004/0110282, n° US 2004/0109865, n° WO 2003/085119, n° WO 2003/084570, n° WO 2005/035586, n° WO 2005/035778, n° WO 2005/053742, n° WO 2002/031140; Okazaki A. et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki N. et al., Biotech. Bioeng. 87:614-622, 2004. Entre los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados se incluyen las células CHO Lec13 deficientes en fucosilación de las proteínas (Ripka J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545, 1986; documentos n° US 2003/0157108 y n° WO 2004/056312, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares inactivadas, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO inactivadas (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki N. et al., Biotech. Bioeng. 87:614-622, 2004; Kanda Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94:680-688, 2006, y el documento n° WO 2003/085107).

Las variantes de anticuerpo se proporcionan además con oligosacáridos bisectados, por ejemplo en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se encuentra bisectado por GlcNAc. Dichas variantes

de anticuerpo pueden presentar un nivel reducido de fucosilación y/o una función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo en, por ejemplo, el documento n° WO 2003/011878, la patente US n° 6.602.684 y el documento n° US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden presentar una función CDC mejorada. Se describen variantes de anticuerpo correspondientes en, por ejemplo, los documentos n° WO 1997/30087, n° WO 1998/58964 y n° WO 1999/22764.

#### c) Variantes de región Fc

En determinadas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente memoria, generando de esta manera una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones aminoácidas.

En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que presenta algunas, aunque no todas, las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo in vivo resulta importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) resultan innecesarias o perjudiciales. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad in vitro y/o in vivo para confirmar la reducción/eliminación de las actividades de CDC y/o de ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión de receptor de Fc (FcR) que garanticen que el complejo no presenta unión a FcγR (por lo tanto que probablemente no presenta actividad de ADCC), aunque conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII únicamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Se resume la expresión de FcR sobre las células hematopoyéticas en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch J.V. y Kiné J.P., Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991. Se describen ejemplos no limitativos de ensayos in vitro para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente US n° 5.500.362 (ver, por ejemplo, Hellstrom I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063, 1986; y Hellstrom I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502, 1985; patente US n° 5.821.337 (ver Bruggemann M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987). Alternativamente, pueden utilizarse métodos de ensayo no radioactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc., Mountain View, CA, y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96®, Promega, Madison, WI). Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el dado a conocer en Clynes R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656, 1998. También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y que por lo tanto no presenta actividad de CDC. Ver, por ejemplo, la ELISA de la unión de C1q y de C3c en los documentos n° WO 2006/029879 y n° WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro H. et al., J. Immunol. Methods 202:163-171, 1996; Cragg M.S. et al., Blood 101:1045-1052, 2003; y Cragg M.S. y M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743, 2004). La unión de FcRn y las determinaciones de eliminación/semivida *in vivo* también pueden llevarse a cabo utilizando métodos conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Petkova S.B. et al., Int. Immunol. 18:1759-1769, 2006). 1759-1769).

Entre los anticuerpos con una función efectora reducida se incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc n° 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente US n° 6.737.056). Entre dichos Fc mutantes se incluyen los Fc mutantes con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoácidas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo la Fc mutante denominada "DANA", con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente US n° 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR (ver, por ejemplo, la patente n° US 6.737.056 y el documento n° WO 2004/056312, y Shields R.L. et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los residuos).

En algunas realizaciones, pueden realizarse alteraciones en la región Fc que resultan en una unión de C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o reducida), por ejemplo tal como se describe en los documentos n° US 6.194.551 y n° WO 99/51642, e Idusogie E.E. et al., J. Immunol. 164:4178-4184, 2000.

Los anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), el cual es

responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer R.L. et al., J. Immunol. 117:587-593, 1976, y Kim J.K. et al., J. Immunol. 24:2429-2434, 1994) se describen en el documento nº US 2005/0014934. Dichos anticuerpos comprende una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Entre dichas Fc variantes se incluyen aquéllas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434, por ejemplo la sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente US nº 7.371.826).

Ver también Duncan A.R. y Winter G., Nature 322:738-740, 1988; patentes US nº 5.648.260 y nº 5.624.821 y el documento nº WO 94/29351, referentes a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

#### d) Variantes de anticuerpo por manipulación de las cisteínas

En determinadas realizaciones puede resultar deseable crear anticuerpos con manipulación de las cisteínas, por ejemplo los "tioMAb", en los que se sustituyen uno o más residuos de un anticuerpo por residuos de cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos se encuentran en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de aquellos residuos con cisteína, se sitúan los grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otros grupos, tales como grupos farmacológicos o grupos de molécula conectora-fármaco, con el fin de crear un inmunoconjugado, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria. En determinadas realizaciones, puede sustituirse por cisteína uno o más cualesquiera de los residuos siguientes: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración EU) de la cadena pesada y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos con manipulación de cisteínas tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 7.521.541.

#### e) Derivados de anticuerpo

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente memoria puede modificarse adicionalmente para que contenga fracciones no proteicas adicionales que son conocidos de la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Entre los grupos adecuados para la derivatización del anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polímeros solubles en agua. Entre los ejemplos no limitativos de polímeros solubles en agua se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas de preparación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y en el caso de que se una más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones entre las que se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que debe mejorarse, la opción de que el derivado de anticuerpo se utilice en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y fracción no proteica que pueden calentarse selectivamente mediante exposición a radiación. En una realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605, 2005). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, aunque sin limitarse a ellas, longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan la fracción no proteica hasta una temperatura a la que las células próximas al anticuerpo-fracción no proteica resultan eliminadas.

#### Compuestos haptencilados

El hapteno en un conjugado tal como se informa en la presente memoria puede conjugarse, si no es por sí mismo una de las moléculas, con un agente terapéutico (fármaco), un agente citotóxico (por ejemplo una toxina tal como doxorubicina o toxina Pertussis), un fluoróforo tal como un pigmento fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para la obtención de imágenes o un metal radioterapéutico, un marcaje peptídico o no peptídico o una etiqueta de detección, o un agente modificador de la eliminación, tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro carbohidrato o agente lipofílico. Dicho conjugado se denomina compuesto haptencilado. La conjugación puede ser directa o mediante un conector intermedio.

#### a) Fracciones terapéuticas

La fracción fármaco (D) del conjugado con hapteno-fármaco (CAF, fármaco haptencilado) puede ser cualquier compuesto, fracción o grupo que presenta un efecto citotóxico o citostático. Entre las fracciones fármaco se incluyen:

(i) agentes quimioterapéuticos, que pueden funcionar como inhibidores de microtúbulos, inhibidores de la mitosis, inhibidores de topoisomerasa, o intercalantes de ADN, (ii) toxinas proteicas, que pueden funcionar enzimáticamente, e (iii) isótopos radioactivos.

5 Entre las fracciones fármaco ejemplares se incluyen, aunque sin limitación, un maitansinoide, una auristatina, una dolastatina, un tricoteceno, CC1065, una caliqueamicina y otros antibióticos enediina, un taxano, una antraciclina, y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de los mismos.

10 Entre las toxinas proteínas se incluyen la cadena A diftérica, los fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina (Vitetta et al., Science 238:1098, 1987), la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos (documento nº WO 93/21232).

15 Entre los isótopos radioactivos terapéuticos se incluyen  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{B}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ , e isótopos radioactivos de Lu.

20 El isótopo radioactivo u otros marcajes pueden incorporarse de maneras conocidas (Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57, 1978; "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press, 1989). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleido al complejo (documento nº WO 94/11026).

#### b) Marcajes

25 El compuesto haptencilado puede ser un marcaje haptencilado. Puede utilizarse cualquier fracción de marcaje que pueda unirse covalentemente al hapteno (ver, por ejemplo, Singh et al., Anal. Biochem. 304:147-15, 2002; Harlow E. y Lane D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999; Lundblad R. L., Chemical Reagents for Protein Modification, 2a ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991). El marcaje puede funcionar: (i) proporcionando una señal detectable, (ii) interactuando con un segundo marcaje para modificar la señal detectable proporcionada por el primer o segundo marcaje, por ejemplo para proporcionar FRET (transferencia de energía por resonancia fluorescente), (iii) afectando la movilidad, por ejemplo la movilidad electroforética o la permeabilidad celular, por carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (iv) proporcionando una fracción de captura, por ejemplo modulando el acomplejamiento iónico.

35 Los conjugados que comprenden un marcaje haptencilado tal como se informa en la presente memoria pueden resultar útiles en ensayos diagnósticos, por ejemplo para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero. Para las aplicaciones diagnósticas, se utiliza un anticuerpo biespecífico en el que la primera especificidad de unión se une a una diana y la segunda especificidad de unión se une a un marcaje haptencilado. El hapteno típicamente se marca con una fracción detectable. Se dispone de numerosos marcajes, los cuales pueden clasificarse generalmente en las categorías siguientes:

45 (a) Isótopos radioactivos (radionucleidos), tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Gn}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{99}\text{TC}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  o  $^{211}\text{Bi}$ . Los conjugados marcados con isótopo radioactivo resultan útiles en experimentos de obtención de imágenes dirigidos a receptores. El antígeno (hapteno) puede marcarse con reactivos ligandos que se unen, quelan o de otra modo acomplejan un metal isótopo radioactivo utilizando las técnicas indicadas en Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, 1991, pubs. Entre los ligandos quelantes que pueden acomplejarse con un ión metálico se incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, Tex.). Los radionucleidos pueden ser dianas mediante acomplejamiento con el complejo tal como se informa en la presente memoria (Wu et al., Nature Biotechnology 23(9):1137-1146, 2005). La obtención de imágenes de dianas receptores con complejos marcados con radionucleido pueden proporcionar un marcador de activación de la ruta mediante la detección y cuantificación de la acumulación progresiva de complejos o anticuerpos terapéuticos correspondientes en tejido tumoral (Albert et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210, 1998).

55 Los complejos de metal-quelato adecuados como marcajes para experimentos de obtención de imágenes (documento nº US 2010/0111856, patentes US nº 5.342.606, nº 5.428.155, nº 5.316.757, nº 5.480.990, nº 5.462.725, nº 5.428.139, nº 5.385.893, nº 5.739.294, nº 5.750.660, nº 5.834.456; Hnatowich et al., J. Immunol. Methods 65:147-157, 1983; Meares et al., Anal. Biochem. 142:68-78, 1984; Mirzadeh et al., Bioconjugate Chem. 1:59-65, 1990; Meares et al., J. Cancer, supl. 10:21-26, 1990; Izard et al., Bioconjugate Chem. 3:346-350, 1992; Nikula et al., Nucl. Med. Biol. 22:387-90, 1995; Camera et al., Nucl. Med. Biol. 20:955-62, 1993; Kukis et al., J. Nucl. Med. 39:2105-2110, 1998; Verel et al., J. Nucl. Med. 44:1663-1670, 2003; Camera et al., J. Nucl. Med. 21:640-646, 1994; Ruegg et al., Cancer Res. 50:4221-4226, 1990; Verel et al., J. Nucl. Med. 44:1663-1670, 2003; Lee et al., Cancer Res. 61:4474-4482, 2001; Mitchell et al., J. Nucl. Med. 44:1105-1112, 2003; Kobayashi



et al., *Bioconjugate Chem.* 10:103-111, 1999; Miederer et al., *J. Nucl. Med.* 45:129-137, 2004; DeNardo et al., *Clinical Cancer Research* 4:2483-90, 1998; Blend et al., *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363, 2003; Nikula et al., *J. Nucl. Med.* 40:166-76, 1999; Kobayashi et al., *J. Nucl. Med.* 39:829-36, 1998; Mardirossian et al., *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74, 1993; Roselli et al., *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 14:209-20, 1999).

(b) Marcajes fluorescentes, tales como quelatos de tierra rara (quelatos de europio), tipos de fluoresceína, incluyendo FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-fluoresceína, tipos de rodamina, incluyendo TAMRA; dansilo; lisamina; cianinas; ficoeritrinas, rojo de Texas, y análogos de los mismos. Los marcajes fluorescentes pueden conjugarse con el antígeno (hapteno) utilizando las técnicas dadas a conocer en *Current Protocols in Immunology*, *supra*, por ejemplo. Entre los pigmentos fluorescentes y reactivos de marcaje fluorescente se incluyen los disponibles comercialmente de Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, Oregon, UAS) y Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Ill).

Los marcajes de detección, tales como los pigmentos fluorescentes y los pigmentos quimioluminiscentes (Briggs et al., "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids", *J. Chem. Soc., Perkin-Trans.* 1:1051-1058, 1997) proporcionan una señal detectable y son generalmente aplicables al marcaje, especialmente con las propiedades siguientes: (i) el conjugado marcado debe producir una señal muy alta con un nivel de fondo bajo, de manera que puedan detectarse con precisión cantidades pequeñas de conjugado tanto en ensayo sin células como en ensayos celulares, e (ii) el conjugado marcado debe ser fotoestable, de manera que pueda observarse la señal fluorescente, monitorizarse y registrarse sin fotoblanqueo significativo. Para aplicaciones que implican la unión a superficie celular de conjugados marcados a membranas o superficies celulares, especialmente de células vivas, los marcajes deben (iii) presentar una buena solubilidad en agua para conseguir una concentración de conjugado y sensibilidad de detección eficaces, e (iv) no resulten tóxicos para las células vivas, de manera que no interrumpan los procesos metabólicos normales de las células o provoquen la muerte celular prematura.

(c) Se encuentran disponibles o se dan a conocer diversos marcajes de enzima-sustrato (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.275.149). El enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, el enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, el enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y seguidamente puede emitir luz que puede medirse (utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Entre los ejemplos de marcajes enzimáticos se incluyen las luciferasas (por ejemplo la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana; patente US nº 4.737.456), la luciferina, las 2,3-dihidroftalazinodionas, la malato deshidrogenasa, la ureasa, peroxidasa tales como la peroxidasa de rábano picante (PRP), la fosfatasa alcalina (FA) (3-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas) (por ejemplo glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con polipéptidos se describen en O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en: *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone y IT Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166, 1981.

Entre los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato (patentes US nº 4.275.149 y nº 4.318.980) se incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (PRP) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un pigmento precursor (por ejemplo ortofenilén-diamina (OFD) o hidrocloreuro de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB),

(ii) fosfatasa alcalina (FA) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico, y

(iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa).

El conjugado marcado tal como se informa en la presente memoria puede utilizarse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, páginas 147 a 148, CRC Press, Inc., 1987).

Los conjugados marcados tal como se informan en la presente memoria resultan útiles como biomarcadores y sondas de imagen mediante los diversos métodos y técnicas de obtención de imágenes biomédicas y moleculares, tales como: (i) IRM (imagen por resonancia magnética); (ii) MicroTC (tomografía computerizada); (iii) TCEMF (tomografía computerizada de emisión monofotónica); (iv) TEP (tomografía de emisión positrónica), Tinianow J. et al., *Nuclear Medicine and Biology* 37(3):289-297, 2010; Chen et al., *Bioconjugate Chem.* 15:41-49, 2004; documento nº US 2010/0111856; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia, e (vii) ultrasonidos. La inmunoescintigrafía es un

procedimiento de obtención de imágenes en el que los conjugados marcados con sustancias radioactivas se administran en un animal o paciente humano y se obtiene una fotografía de sitios del cuerpo en que se localiza el conjugado (patente US nº 6.528.624). Los biomarcadores de imagen pueden medirse objetivamente y evaluarse como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: los marcadores de tipo 0 son marcadores de la historia natural de una enfermedad y se correlacionan longitudinalmente con índices clínicos conocidos, por ejemplo la evaluación de IRM de la inflamación sinovial en la artritis reumatoide; los marcadores de tipo I capturan el efecto de una intervención según un mecanismo de acción, aunque el mecanismo puede no encontrarse asociado al resultado clínico; los marcadores de tipo II funcionan como puntos finales sustitutivos en los que el cambio en el biomarcador o señal procedente del mismo predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta dirigida, tal como la erosión ósea medida en la artritis reumatoide mediante TC. De esta manera, los biomarcadores de imagen pueden proporcionar información terapéutica farmacodinámica (FQ) sobre: (i) la expresión de una proteína diana, (ii) la unión de un terapéutico a la proteína diana, es decir, la selectividad, e (iii) los datos farmacocinéticos de eliminación y semivida. Entre las ventajas de los biomarcadores de imagen in vivo respecto a biomarcadores de laboratorio se incluyen: el tratamiento no invasivo, la evaluación de cuerpo completo cuantificable, la administración y evaluación repetida, es decir en múltiples puntos temporales, y efectos potencialmente transferibles de resultados preclínicos (animales pequeños) a clínicos (seres humanos). Para algunas aplicaciones, las imágenes biológicas sustituyen o minimizan los experimentos animales en estudios preclínicos.

Los métodos de marcaje de péptidos son bien conocidos. Ver Haugland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., 2003; Brinkley, *Bioconjugate Chem.* 3:2, 1992; Garman, *Non-Radioactive Labeling: A Practical Approach*, Academic Press, London, 1997; Means, *Bioconjugate Chem.* 1:2, 1997; Glazer et al., *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work y E. Work, editores) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad R. L. y Noyes C. M., *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I y II, CRC Press, New York, 1984; Pfeleiderer G., "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin y New York, 1985; y Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991; DeLeon-Rodriguez et al., *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155, 2004; Lewis et al., *Bioconjugate Chem.* 12:320-324, 2001; Li et al., *Bioconjugate Chem.* 13:110-115, 2002; Mier et al., *Bioconjugate Chem.* 16:240-237, 2005.

#### Conjugados de anticuerpos

El anticuerpo en un conjugado tal como se informa en la presente memoria puede conjugarse adicionalmente, si no es por sí mismo una de las moléculas, con un agente terapéutico (fármaco), un agente citotóxico (por ejemplo una toxina tal como doxorubicina o toxina Pertussis), un fluoróforo tal como un pigmento fluorescente como fluoresceína o rodamina, un agente quelante para la obtención de imágenes o un metal radioterapéutico, un marcaje peptídico o no peptídico o una etiqueta de detección, o un agente modificador de la eliminación, tal como diversos isómeros de polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente, u otro carbohidrato o agente lipofílico.

#### Inmunconjugados

En la presente memoria se proporcionan además inmunconjugados que comprenden un anticuerpo tal como se informa en la presente memoria o un conjugado tal como se informa en la presente memoria con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos o fármacos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radioactivos.

En una realización, un inmunconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (CAF) en el que se conjuga un anticuerpo con uno o más fármacos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, un maitansinoide (ver las patentes US nº 5.208.020 y nº 5.416.064 y la patente EP nº 0 425 235 B1), una auristatina tal como las fracciones de fármaco monometil-auristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver las patentes US nº 5.635.483, nº 5.780.588 y nº 7.498.298), una dolastatina, una caliqueamicina o un derivado de los mismos (ver las patentes US nº 5.712.374, nº 5.714.586, nº 5.739.116, nº 5.767.285, nº 5.770.701, nº 5.770.710, nº 5.773.001 y nº 5.877.296; Hinman L.M. et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342, 1993, y Lode H.N. et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928, 1998), una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz F. et al., *Curr. Med. Chem.* 13:477-523, 2006; Jeffrey S.C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:358-362, 2006; Torgov M.Y. et al., *Bioconjug. Chem.* 16:717-721, 2005; Nagy A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834, 2000; Dubowchik G.M. et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532, 2002; King H.D. et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343, 2002 y patente US nº 6.630.579); metotrexato, vindesina, un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tasetaxel y ortataxel, un tricoteceno, y CC1065

En otra realización, un inmunconjugado comprende un anticuerpo tal como se indica en la presente memoria conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, la cadena A diftérica, fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de

*Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo tal como se indica en la presente memoria o un complejo tal como se indica en la presente memoria conjugado con un átomo radioactivo formando un radioconjugado. Se encuentra disponible una diversidad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radioactivos de Lu. Al utilizar el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo  $Tc^{99m}$  o  $I^{123}$ , o un marcaje de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como obtención de imágenes de resonancia magnética, IRM), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden prepararse conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (PSPD), ciclohexán-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (CCSM), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoi)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta E.S. et al., Science 238:1098-1104, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno-triamina-pentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Ver el documento nº WO 94/11026. El conector puede ser un "conector cortable" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, un conector lábil a ácidos, un conector sensible a peptidasas, un conector fotolábil, un conector dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari R.V. et al., Cancer Res. 52:127-131, 1992; patente US nº 5.208.020).

Los inmunoconjugados o CAF en la presente memoria contemplan expresamente, aunque sin limitación, dichos conjugados preparados con reactivos entrecruzantes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (benzoato de succinimidil-(4-vinilsulfona)), que se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

#### Conectores

El término "conector" se refiere a una fracción bifuncional o multifuncional que puede utilizarse para conjugar (unir) el antígeno (por ejemplo un hapteno) con otras fracciones, tales como marcajes o fármacos detectables. Los conjugados de antígeno (hapteno) pueden prepararse convenientemente utilizando un conector que presenta funcionalidad para la unión al fármaco, al antígeno (hapteno) y al anticuerpo anti-hapteno.

En una realización, un conector presenta un sitio reactivo que presenta un grupo electrofílico que es reactivo con un grupo nucleofílico presente en el anticuerpo anti-hapteno. Un grupo tiol de la cisteína en el anticuerpo, por ejemplo, es reactivo con un grupo electrofílico en el conector y forma un enlace covalente con el conector. Entre los grupos electrofílicos útiles se incluyen otro tiol, grupos maleimida y haloacetamida (ver, por ejemplo, el método de conjugación en la página 766 de Klussman et al., Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, 2004).

Entre los ejemplos de grupos funcionales reactivos con tiol se incluyen tiol, maleimida, alfa-haloacetilo, ésteres activados, tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos.

El conector puede comprender residuos aminoácidos que unen el antígeno (hapteno) a la carga. Los residuos aminoácidos pueden formar una unidad dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Entre los residuos aminoácidos se incluyen los presentes naturalmente, así como los análogos de aminoácido no naturales, tales como, por ejemplo, la citrulina o los  $\beta$ -aminoácidos, tales como, por ejemplo, la  $\beta$ -alanina, o los  $\omega$ -aminoácidos, tales como el ácido 4-aminobutírico.

En otra realización, el conector presenta un grupo funcional reactivo que presenta un grupo electrofílico que es reactivo con un grupo nucleofílico presente en el antígeno (hapteno) o el anticuerpo (anticuerpo anti-hapteno). Entre los grupos electrofílicos útiles se incluyen los grupos carbonilos de aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de un conector puede reaccionar con un grupo electrofílico en el hapteno o el anticuerpo y formar un

enlace covalente con un antígeno (hapteno) o el anticuerpo. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un conector se incluyen hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina e hidrazida de arilo. El grupo electrofílico en un antígeno (hapteno) proporciona un sitio conveniente para la unión a un conector.

5 Típicamente pueden prepararse conectores de tipo peptídico mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el método de síntesis en fase líquida (E. Schroder y K. Lubke, "The Peptides", volumen 1:76-136, 1965, Academic Press), que es bien conocido en el campo de la química de los péptidos.

10 En otra realización, el conector puede sustituirse con grupos que modulan la sensibilidad o la reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado, tal como el sulfonato ( $\text{SO}_3^-$ ) o amonio o un polímero tal como PEG, pueden incrementar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo conector con el antígeno (hapteno) o la fracción fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento dependiendo de la ruta sintética utilizada.

15 Los conjugados que comprenden un fármaco o marcaje tal como se informa en la presente memoria contemplan expresamente, aunque sin limitación, complejos preparados con reactivos conectores:

20 BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) e incluyendo reactivos bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)<sub>3</sub>, and BM(PEO)<sub>4</sub>, que se encuentran comercialmente disponibles de Pierce Biotechnology, Inc. Los reactivos bis-maleimida permiten la unión de, por ejemplo un grupo tiol, a una fracción fármaco que contiene tiol, marcaje o intermediario de conector, de manera secuencial o concurrente. Entre otros grupos funcionales aparte de la maleimida que son reactivos con, por ejemplo, un grupo tiol se incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinilpiridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.

30 Entre los conectores ejemplares se incluyen un reactivo conector dipéptido valina-citrulin (val-cit o vc) que presenta un tramo de maleimidias y un espaciador autoinmolante para-aminobencilcarbamaoilo (PAB) y un reactivo conector dipéptido Phe-Lys (Mtr) que presenta una unidad de tramo de maleimidias y un espaciador autoinmolante de p-aminobencilo.

35 Los grupos tiol de la cisteína son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en reactivos conectores y compuestos haptencilados, incluyendo: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido, (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas, (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida, e (iv) disulfuros, incluyendo disulfuros de piridilo, mediante intercambio de sulfuros. Entre los grupos nucleofílicos en un compuesto haptencilado se incluyen: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en fracciones conectoras y reactivos conectores.

### III. Ácidos nucleicos

45 El ADN codificante de la variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo tal como se informa en la presente memoria o tal como está comprendido en un conjugado tal como se informa en la presente memoria puede prepararse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen la preparación mediante mutagénesis dirigida a sitio (o mediada por oligonucleótido), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de un ADN preparado anteriormente codificante del polipéptido. Las variantes de anticuerpos recombinantes también pueden construirse mediante manipulación de fragmentos de restricción o mediante PCR de extensión por solapamiento con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican la sustitución o sustituciones de codones de cisteína. Pueden utilizarse técnicas de mutagénesis estándares para generar ADN codificante de dichos anticuerpos manipulados modificados. Puede encontrarse una guía general en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y en Ausubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993.

### IV. Expresión y purificación

60 Pueden producirse anticuerpos utilizando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo tal como se indica en la patente US nº 4.816.567. En una realización, se proporciona un ácido nucleico aislado codificante de un anticuerpo indicado en la presente memoria. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por

ejemplo vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula huésped comprende (por ejemplo ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariótica, por ejemplo una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo una célula Y0, NS0 ó Sp20). En una realización, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo tal como se informa en la presente memoria, en el que el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico codificante del anticuerpo, tal como se ha proporcionado anteriormente, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo a partir de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo tal como se informa en la presente memoria, se aísla un ácido nucleico codificante de un anticuerpo, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la clonación adicional y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores codificantes de anticuerpos se incluyen las células procarióticas o eucarióticas indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular en el caso de que la glucosilación y la función efectora de Fc no resulten necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.648.237, nº 5.789.199 y nº 5.840.523 (ver también Charlton K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (editor), Humana Press, Totowa, NJ, 2003, páginas 245 a 254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Tras la expresión, el complejo puede aislarse a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas rutas de glucosilación han sido "humanizadas", resultando en la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross T.U., *Nat. Biotech.* 22:1409-1414, 2004, y Li H. et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215, 2006.

También se derivan células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen las células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden utilizarse conjuntamente con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.959.177, nº 6.040.498, nº 6.420.548, nº 7.125.978 y nº 6.417.429 (que describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden utilizarse células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden resultar útiles líneas celulares de mamífero adaptadas para el crecimiento en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7), la línea renal embrionaria humana (293 ó células 293 tal como se describe en, por ejemplo, Graham F.L. et al., *J. Gen. Virol.* 36:59-74, 1977), células renales de hámster neonato (BHK), células de sertoli de ratón (células TM4 tal como se describe en, por ejemplo, Mather J.P., *Biol. Reprod.* 23:243-252, 1980), las células renales de mono (CV1), las células renales de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma cervical humano (HELA), células renales caninas (MDCK), células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A), células pulmonares humanas (W138), células hepáticas humanas (Hep G2), tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI, tal como se describe en, por ejemplo, Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68, 1982; células MRC 5 y células FS4. Entre otras líneas celulares huésped de mamífero útiles se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo las células CHO DHFR<sup>r</sup> (Urlaub G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980) y las líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos ver, por ejemplo, Yazaki P. y Wu A.M., *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (editor), Humana Press, Totowa, NJ, 2004, páginas 255-268.

#### V. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En determinadas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos, especialmente anticuerpos biespecíficos, y conjugados tal como se informan en la presente memoria resulta útil para la detección de la presencia de una o más moléculas diana en una muestra biológica. El término "detección" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la detección cuantitativa o cualitativa. En una realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido.

En una realización, se proporciona un anticuerpo o conjugado tal como se informa en la presente memoria para la utilización en un método de diagnóstico o detección. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o conjugado tal como se indica en la presente memoria, bajo condiciones permisivas de la unión del anticuerpo o el conjugado a la diana y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo o el conjugado y la diana. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.

En determinadas realizaciones, se proporcionan anticuerpos o conjugados marcados. Entre los marcajes se incluyen marcajes o fracciones que se detectan directamente (tales como marcajes fluorescentes, cromofóricos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como fracciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo mediante una reacción enzimática o una interacción molecular. Entre los marcajes ejemplares se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los isótopos radioactivos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  e  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente US nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (PRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido, por ejemplo glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con un enzima que utiliza el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor-pigmento, tal como PRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcajes de espín, marcajes de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

#### VI. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo o conjugado tal como se indica en la presente memoria mediante la mezcla de dicho anticuerpo o conjugado que presenta el grado de pureza deseado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A. (editor), 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas y entre ellos se incluyen: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamónico, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Entre los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente memoria se incluyen además agentes de dispersión de fármaco intersticial, tales como glucoproteínas hialuronidasa solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo las glucoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.). Determinados sHASEGP ejemplares y métodos de utilización, incluyendo rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente US nº 2005/0260186 y nº 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones liofilizadas ejemplares de anticuerpos en la patente US nº 6.267.958. Entre las formulaciones acuosas de anticuerpos se incluyen las indicadas en los documentos nº US 6.171.586 y nº WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación en la presente memoria también puede contener más de un ingrediente activo, según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presente efectos mutuos adversos. Dichos ingredientes activos se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden encapsularse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A.,

editor, 1980.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo o conjugado, en las que las matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas.

Las formulaciones que deben utilizarse para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad puede alcanzarse fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estéril.

#### VII. Métodos y composiciones terapéuticos

Puede utilizarse cualquiera de los anticuerpos o conjugados informados en la presente memoria en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo o un conjugado tal como se informa en la presente memoria, para la utilización a modo de medicamento. Se proporciona un anticuerpo o un conjugado tal como se informa en la presente memoria, para la utilización en el tratamiento de una enfermedad. En determinadas realizaciones se proporciona un anticuerpo un conjugado tal como se informa en la presente memoria, para la utilización en un método de tratamiento. En determinadas realizaciones, la presente memoria proporciona un anticuerpo o un conjugado tal como se informa en la presente memoria para la utilización en un método de tratamiento de un individuo que comprende administrar en el individuo una cantidad eficaz del anticuerpo o conjugado tal como se informa en la presente memoria. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la utilización de un anticuerpo o un conjugado tal como se informa en la presente memoria, en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad. En una realización adicional, el medicamento está destinado a la utilización en un método de tratamiento de una enfermedad, que comprende administrar en un individuo que presenta una enfermedad, una cantidad eficaz del medicamento. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En la presente memoria se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad. En una realización, el método comprende administrar en un individuo que presenta dicha enfermedad, una cantidad efectiva de un anticuerpo o de un conjugado tal como se informa en la presente memoria. En una de dichas realizaciones, el método comprende además la administración en el individuo de una cantidad efectiva de por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se describe posteriormente. Un "individuo" según cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos o conjugados tal como se informa en la presente memoria, por ejemplo para la utilización en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriormente indicados. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos o conjugados tal como se informa en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos o conjugados tal como se informa en la presente memoria y por lo menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo tal como se indica posteriormente.

Los anticuerpos y conjugados tal como se informan en la presente memoria pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, puede coadministrarse un anticuerpo o conjugado tal como se informa en la presente memoria con por lo menos un agente terapéutico adicional.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede realizarse antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos y conjugados tal como se informa en la presente memoria también pueden utilizarse en combinación con terapia de radiación.

Un anticuerpo o conjugado tal como se informa en la presente memoria (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e

intranasal y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede realizarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo mediante inyecciones, tales como las inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se encuentran contempladas dentro de la presente memoria diversos programas de dosificación, aunque sin limitación, las administraciones individuales o múltiples en diversos puntos del tiempo, la administración de bolo y la infusión de pulsos.

Los anticuerpos o conjugados tal como se informan en la presente memoria pueden formularse, administrarse de un modo consistente con la buena práctica médica. Entre los factores a considerar en el presente contexto se incluyen el trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular bajo tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por el profesional médico. El anticuerpo o conjugado opcionalmente, no necesariamente, se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo o conjugado presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores comentados anteriormente. Estos generalmente se utilizan en las mismas dosis y por vías de administración tales como las indicadas en la presente memoria, o entre aproximadamente 1% y 99% de las dosis indicadas en la presente memoria, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que resulta apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo o conjugado tal como se informa en la presente memoria (utilizado solo o en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, del tipo de anticuerpo o conjugado, de la severidad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo o conjugado, y del criterio del médico responsable. El anticuerpo o conjugado se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial puede ser de entre aproximadamente 1 µg/kg y 15 mg/kg (por ejemplo de entre 0,5 mg/kg y 10 mg/kg) de anticuerpo o conjugado para la administración en el paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo o conjugado se encontraría comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. De esta manera, puede administrarse en el paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg ó 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de manera que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. Se realiza fácilmente un seguimiento del avance de dicha terapia utilizando técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriormente indicados puede llevarse a cabo utilizando un inmunocombinado tal como se informa en la presente memoria en sustitución o adicionalmente a un anticuerpo o conjugado tal como se informa en la presente memoria.

#### VIII. Artículos fabricados

En la presente memoria se informa de un artículo fabricado que contiene materiales que resultan útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos indicados anteriormente. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o impreso en el paquete o asociado al recipiente. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta, por sí misma o en combinación contra composición, efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar la condición y que puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o complejo tal como se informa en la presente memoria. La etiqueta o impreso en el paquete indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección. Además, el artículo fabricado puede comprender: (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo o un complejo tal como se informa en la presente memoria, y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo fabricado en la presente realización puede comprender además un impreso en el paquete que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una condición particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además



un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

5 Se entiende que cualquiera de los artículos fabricados anteriormente indicados puede incluir un inmunoconjugado en sustitución o adicionalmente a un anticuerpo o conjugado tal como se informa en la presente memoria.

10 Los ejemplos, figuras y secuencias siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

15 Aislamiento y caracterización de ADNc codificantes de los dominios VH y VL de un anticuerpo anti-digoxigenina murino y un anticuerpo anti-biotina murino de la clase IgG1 con cadena ligera kappa de hibridoma de ratón

20 El aislamiento y caracterización de los ADNc codificantes de los dominios VH y VL de anticuerpos anti-digoxigenina, la preparación de ARN, la generación de fragmentos de ADN, la clonación de los fragmentos de ADN en plásmidos y la determinación de las secuencias de ADN y de aminoácidos han sido descritas en los documentos nº WO 2011/003557 y nº WO 2011/003780, respectivamente.

25 La información de proteína y de secuencia (de ADN) de los dominios VH y VL de los anticuerpos murinos ligantes de hapteno se obtuvo directamente de los clones de hibridoma. Las etapas experimentales realizadas seguidamente fueron: (i) aislamiento del ARN a partir de células de hibridoma productoras de anticuerpos, (ii) la conversión de dicho ARN en ADNc, la transferencia a fragmentos de PCR que incluyen VH y VL, e (iii) la integración de dichos fragmentos de PCR en vectores plásmido para la propagación en *E. coli* y la determinación de sus secuencias de ADN (y las deducidas de proteína).

30 Preparación de ARN a partir de células de hibridoma:

35 Se preparó ARN a partir de  $5 \times 10^6$  células de hibridoma expresantes de anticuerpos utilizando el kit RNeasy (Qiagen). Brevemente, se lavaron las células sedimentadas una vez en PBS y se sedimentaron y posteriormente resuspendieron para la lisis en 500  $\mu$ l de tampón RLT (+ $\beta$ -ME). Las células se lisaron completamente pasándolas por un Qiashredder (Qiagen) y después se sometieron al procedimiento de purificación mediado por matriz (EtOH, columnas RNeasy) tal como indica el manual del fabricante. Tras la última etapa de lavado, se recuperó el ARN de las columnas en 50  $\mu$ l de agua libre de ARNasa. Se determinó la concentración del ARN recuperado mediante la cuantificación de A260 y A280 de muestras diluidas 1:20. Se analizó la integridad (calidad, grado de degradación) de las muestras de ARN aislado mediante electroforesis en gel desnaturizante del ARN en geles de formamida-agarosa (ver el manual de Maniatis). Se obtuvieron bandas discretas que representan los ARN ribosómicos 18s y 28s intactos y el hecho de que estén intactas (y con proporciones de intensidad de aprox. 2:1) estas bandas indica la buena calidad de las preparaciones de ARN. Los ARN aislados a partir del hibridoma se congelaron y se almacenaron a -80°C en alícuotas.

45 Generación de fragmentos de ADN codificantes de VH y VL mediante PCR RACE, clonación de dichos fragmentos de ADN en plásmidos y determinación de sus secuencias de ADN y de aminoácidos

50 El ADNc para las reacciones de PCR (RACE-) siguientes se preparó a partir de preparaciones de ARN mediante la aplicación de las tecnologías descritas en la solicitud de patente internacional nº PCT/EP2011/074273. A continuación, se aislaron los fragmentos de PCR codificantes de VH y VL mediante extracción de gel de agarosa y la posterior purificación mediante técnicas estándares de biología molecular. Se insertaron fragmentos de PCR purificados generados con Pwo en el vector pCR bluntII topo mediante la aplicación del kit pCR bluntII topo Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de ligación Topo se transformaron en células *E. coli* Top10 OneShot competentes. A continuación, se identificaron los clones de *E. coli* que contenían vectores con inserciones que contenían VL o VH como colonias sobre placas de ágar de LB/canamicina. Los plásmidos se prepararon a partir de dichas colonias y se confirmó la presencia de la inserción deseada en el vector mediante de restricción con EcoRI. Debido a que el esqueleto del vector contiene sitios de reconocimiento de restricción de EcoRI que flanquean cada lado de la inserción, se definieron los plásmidos que alojaban las inserciones como los que presentaban inserciones liberables con EcoRI de aprox. 800 pb (para VL) o 600 pb (para VH). La secuencia de ADN y la secuencia proteica deducida de VL y VH se determinaron mediante secuenciación automática del ADN en múltiples clones de VH y VL.

La secuencia de VL murina del anticuerpo anti-biotina se ilustra en SEC ID nº 40. La secuencia de VH murina del anticuerpo anti-biotina se ilustra en SEC ID nº 36.

5 La secuencia de VL murina del anticuerpo anti-digoxigenina se ilustra en SEC ID nº 08. La secuencia de VH murina del anticuerpo anti-digoxigenina se ilustra en SEC ID nº 04.

#### Ejemplo 2

10 Aislamiento y caracterización de ADNc codificantes de los dominios VH y VL de un anticuerpo anti-teofilina murino de clase IgG1 con cadena ligera kappa de hibridoma de ratón

Las secuencias del anticuerpo anti-teofilina se obtuvieron tal como se indica de manera general en el Ejemplo 1.

15 La secuencia de VL murina del anticuerpo anti-teofilina se ilustra en SEC ID nº 72. La secuencia de VH murina del anticuerpo anti-teofilina se ilustra en SEC ID nº 68.

#### Ejemplo 3

20 Humanización de los dominios VH y VL de los anticuerpos murinos anti-digoxigenina y anti-biotina

La generación de variantes humanizadas del anticuerpo ligante de digoxigenina se ha descrito en detalle en los documentos nº WO 2011/003557 y nº WO 2011/003780. El anticuerpo murino ligante de biotina muM33 se humanizó de una manera similar de la manera siguiente:

25 la generación y caracterización de las secuencias codificantes y las secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo murino anti-biotina de clase IgG1 con cadena ligera kappa de hibridoma de ratón se describen en los documentos nº WO 2011/003557 y nº WO 2011/003780. Basándose en esta información, se generó un anticuerpo anti-biotina humanizado correspondiente (M33\_hu) basado en la combinación de marco de línea germinal humana IGFV1-69-02 y IGKV1-27-01. Para VL no resultó necesario integrar ninguna retromutación en el marco del IGKV1-27-01 humano y el elemento J humano de la línea germinal IGKJ2-01. La VH humanizada se basa en la línea germinal humana IGHV1-69-02 y el elemento J humano de la línea germinal IGHJ4-01-3. Se introdujeron dos retromutaciones en la región marco 1 en la posición 24 (A24S) y en la región marco 3 en la posición 73 (K73T). La secuencia de aminoácidos de la VH humanizada se ilustra en SEC ID nº 44 y la secuencia de aminoácidos de la VL humanizada se ilustra en SEC ID nº 48.

#### Ejemplo 4

40 Humanización de los dominios VH y VL del anticuerpo anti-teofilina murino

El anticuerpo ligante de teofilina murino se humanizó de la manera siguiente: se generó un anticuerpo anti-teofilina humanizado basado en la combinación de marco de línea germinal humana IGHV4-31-02 y IGKV2-30-01. La VH humanizada se basa en la línea germinal humana IGHV4-31-02 y el elemento J humano de la línea germinal IGHJ4-01-3. Se introdujo una retromutación en la región marco 3 en la posición 71 (V71R). La VL humanizada se basa en la línea germinal humana IGHV2-30-01 y el elemento J humano de la línea germinal IGKJ2-01. Se introdujo una retromutación en la región marco 2 en la posición 46 (R46L). La secuencia de aminoácidos de la VH humanizada se ilustra en SEC ID nº 76 y la secuencia de aminoácidos de la VL humanizada se ilustra en SEC ID nº 80.

#### Ejemplo 5

50 Cristalización y determinación de la estructura mediante rayos X de la unión ligante de la región Fv del anticuerpo anti-digoxigenina humano en presencia de digoxigenina y de la región ligante de la región Fv del anticuerpo anti-biotina murino en presencia de biotina

55 La determinación de la estructura del fragmento Fab del anticuerpo ligante de digoxigenina se ha descrito en detalle en los documentos nº WO 2011/003557 y nº WO 2011/003780, también publicados (3RA7) en Metz S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108:8194-8199, 2011.

60 Se determinó la estructura del anticuerpo anti-biotina murino. Por lo tanto, se generaron fragmentos Fab mediante digestión con proteasa de las IgG purificadas y seguidamente se purificaron, utilizando métodos bien conocidos del estado de la técnica (digestión con papaína).

Para la cristalización, el fragmento Fab apo (Fab purificadas) en His-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0 se concentró

hasta 13 mg/ml. Se formaron gotas de cristalización a 21°C mediante la mezcla de 0,2 µl de solución de proteína con 0,2 µl de solución de reservorio en experimentos de difusión de vapor por gota posada. Aparecieron cristales a partir de Tris 0,1 M, pH 8,5, cloruro de cobalto 0,01 M, polivinilpirrolidina K15 al 20% en 5 días y crecieron hasta un tamaño final de 0,3 mm x 0,06 mm x 0,03 mm en 8 días.

5 Se recogieron los cristales con glicerol al 15% como crioprotector y después se congelaron instantáneamente en N<sub>2</sub> líquido. Se recogieron imágenes de difracción con un detector Pilatus 6M a una temperatura de 100°C en la línea del haz X10S1 del Swiss Light Source y se procesaron con los programas XDS (Kabsch W., J. Appl. Cryst. 26:795-800, 1993) y se escalaron con SCALA (obtenido de BRUKER AXS), rindiendo datos con una resolución de 2,22 Å. Este cristal de fragmento Fab pertenece al grupo espacial monoclinico P21 con dimensiones celulares de a=90,23Å b=118,45Å c=96,79Å y β=117,53° y contiene cuatro moléculas de Fab por cada unidad asimétrica cristalográfica (ver la Tabla 3).

15 Se utilizaron programas cristalográficos estándares con el paquete de software CCP4 para resolver la estructura mediante sustitución molecular con PDB entrada 3PQP como modelo de búsqueda, para calcular la densidad electrónica y para refinar la estructura de rayos X (CCP4, Collaborative Computational Project, Acta Crystallogr. D, 760-763, 1994). Se reconstruyeron los modelos estructurales en la densidad electrónica utilizando COOT (Emsley P. et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60:486-501, 2010). Se refinaron las coordenadas con REFMAC5 (Murshudov G.N. et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 53:240-55, 1997) y con autoBUSTER (Global Phasing Ltd.).

Tabla 3: recolección de datos y estadísticos de afinado de la estructura para el apocristal de fragmento Fab de M33\_mu monoclinico

Datos recolectados	
Longitud de onda (Å)	1,0
Resolución <sup>1</sup> (Å)	2,22 (2,34-2,22)
Reflexiones únicas <sup>1</sup>	77716(11301)
Completitud (%) <sup>1</sup>	98,0 (100)
R <sub>comb</sub> (%) <sup>1,2</sup>	6,4 (44,4)
<I/σ> <sup>1</sup>	8,3 (1,7)
Celda unitaria (grupo espacial C2)	a=90,23Å b=118,45Å c=96,73Å y β=117,53°
Afinado	
Resolución (Å)	2,2 (2,28-2,22)
R <sub>crist</sub> <sup>1,3</sup>	20,66 (21,84)
R <sub>libre</sub> <sup>1,4</sup>	25,23 (26,47)
Número de átomos en el afinado	13314
R.m.s. desviaciones respecto a la idealidad Longitudes de enlace (Å) / ángulos (°)	0,01 / 1,21
Ángulos dihédricos cadena principal (%) Más favorecido/permitido/generoso/no permitido <sup>5</sup>	90,4 / 9,1 / 0,3 / 0,2
<sup>1</sup> Los valores entre paréntesis se refieren a las clases de resolución más alta. <sup>2</sup> R <sub>merge</sub> = Σ I-<I> /ΣI en la que I es intensidad. <sup>3</sup> R <sub>crist</sub> = Σ F <sub>o</sub> -<F <sub>c</sub> > /ΣF <sub>o</sub> en la que F <sub>o</sub> es la amplitud observada del factor de estructura y F <sub>c</sub> es la amplitud calculada del factor de estructura. <sup>4</sup> R <sub>libre</sub> se calculó basándose en el 5% de los datos totales omitidos durante el afinado. <sup>5</sup> Calculado con PROCHECK [Laskowski R.A. et al., J. Appl. Crystallogr. 26:283-291, 1993].	

25 Para la cristalización del fragmento Fab en complejo con un derivado de biotina, se obtuvieron cristales apo del fragmento Fab utilizado para los experimentos de inmersión a partir de ácido succínico 0,8 M en 3 días tras el cribado y se dejaron crecer hasta un tamaño final de 0,25 mm x 0,04 mm x 0,04 mm en 5 días. Se disolvió biocitina a una concentración de 100 mM en agua. A continuación, se diluyó el compuesto a una concentración de trabajo de 10 mM en solución de cristalización y se aplicó a los cristales en la gota de cristalización. Los cristales se lavaron tres veces con 2 µl de solución de compuesto 10 mM y se incubaron finalmente durante 16 h con biocitina a 21°C.

35 Se recogieron los cristales con glicerol al 15% como crioprotector y después se congelaron instantáneamente en N<sub>2</sub> líquido. Se recogieron imágenes de difracción con un detector Pilatus 6M a una temperatura de 100°K en la línea del haz X10SA del Swiss Light Source y se procesaron con los programas XDS (Kabsch W., J. Appl. Cryst. 26:795-800, 1993) y se escalaron con SCALA (obtenido de BRUKER AXS), rindiendo datos con una resolución de 2,35 Å. Este cristal de fragmento Fab pertenece al grupo espacial monoclinico P21 con dimensiones celulares de a=89,09Å b=119,62Å c=96,18Å y β=117,15° y contiene cuatro moléculas de Fab por cada unidad asimétrica cristalográfica (ver

la Tabla 4).

Se utilizaron programas cristalográficos estándares con el paquete de software CCP4 para resolver la estructura mediante sustitución molecular con las coordenadas del fragmento Fab apo como modelo de búsqueda, para calcular la densidad electrónica y para refinar la estructura de rayos X a una resolución de 2,5 Å (CCP4). Se reconstruyeron los modelos estructurales en la densidad electrónica utilizando COOT (Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G. y Cowtan K., Features and development of COOT, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60:486-501, 2010). Se refinaron las coordenadas con REFMAC5 (Murshudov G.N. et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 53:240-55, 1997) y con autoBUSTER (Global Phasing Ltd.).

Tabla 4: recolección de datos y estadísticos de afinado de la estructura para el cristal complejo biocitina de fragmento Fab de M33<sub>mu</sub> monoclinico

Datos recolectados	
Longitud de onda (Å)	1,0
Resolución <sup>1</sup> (Å)	2,35 (2,45-2,35)
Reflexiones únicas <sup>1</sup>	74645 (8714)
Complejitud (%) <sup>1</sup>	99,9 (99,9)
R <sub>merge</sub> (%) <sup>1,2</sup>	6,30 (65,00)
<I/σ> <sup>1</sup>	10,29 (1,18)
Celda unitaria (grupo espacial C2)	a=89,09Å b=119,62Å c=96,18Å y β=117,15°
Afinado	
Resolución (Å)	2,5 (2,565-2,500)
R <sub>crist</sub> <sup>1,3</sup>	20,92 (36,86)
R <sub>free</sub> <sup>1,4</sup>	27,56 (47,5)
Número de átomos en el afinado	13656
R.m.s. desviaciones respecto a la idealidad Longitudes de enlace (Å) / ángulos (°)	0,009 / 1,43
Ángulos dihédricos cadena principal (%) Más favorecido/permitido/generoso/no permitido <sup>5</sup>	87,5/12,0/0,2/0,3
<sup>1</sup> Los valores entre paréntesis se refieren a las clases de resolución más alta. <sup>2</sup> $R_{merge} = \frac{\sum  I - \langle I \rangle }{\sum I}$ en la que I es intensidad. <sup>3</sup> $R_{crist} = \frac{\sum  F_o - \langle F_c \rangle }{\sum F_o}$ en la que F <sub>o</sub> es la amplitud observada del factor de estructura y F <sub>c</sub> es la amplitud calculada del factor de estructura. <sup>4</sup> R <sub>libre</sub> se calculó basándose en el 5% de los datos totales omitidos durante el afinado. <sup>5</sup> Calculado con PROCHECK [Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. y Thornton J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure, J. Appl. Crystallogr. 26:283-291, 1993].	

El resultado de la determinación experimental de la estructura se muestra en la figura 33. La forma cristalina del complejo contenía cuatro complejos independientes biocitina:Fab anti-biotina en la unidad asimétrica, con biocitina unida de manera similar a todas las moléculas de Fab. La biocitina se une en un bolsillo formado por las RDC 1 y 3 de la cadena pesada y la totalidad de las 3 RDC de cadena ligera. El bolsillo de unión del ligando está definido por los residuos ASN29, ASP31, THR32, PHE33, GLN35, TRP99 y TRP106 de la cadena pesada y ASN31, TYR32, LEU33, SER34, TYR49, SER50, PHE91 y TYR96 de la cadena ligera. El grupo de cabeza biotina forma enlaces de hidrógeno con residuos de RDC2 y RDC1 en un extremo del bolsillo: N3 de la biocitina interactúa con el oxígeno del hidroxilo de Ser50, mientras que O22 se encuentra en contacto con el nitrógeno de la amida esquelética del mismo residuo. Además, O22 de la biocitina también se encuentra unida mediante enlace de hidrógeno al oxígeno del grupo hidroxilo de Ser34. Además de lo anterior, se observan interacciones hidrofóbicas entre la biocitina y las cadenas laterales aromáticas que revisten el bolsillo de unión. El enlace amida en el extremo de la cola alifática (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> de la biotina se apila sobre PHE33 de la RDC1 de cadena pesada y resulta estabilizado por un enlace de hidrógeno adicional unido al nitrógeno de la amida esquelética de PHE33 y a Asp31. Lo anterior sitúa el nitrógeno de la amida, que es el sitio de enlace a la entidad activa, de una manera que los átomos que siguen al nitrógeno apuntan hacia afuera del bolsillo de unión, hacia el solvente.

Los resultados de la determinación experimental de la región de unión a una resolución de 2,5 Å permite caracterizar el modo de unión del ligando a su anticuerpo, lo que es un requisito previo para el modelaje detallado y la mejora adicional mediante manipulación de la proteína de los módulos ligante de biotina recombinantes.

#### Ejemplo 6

Definición y generación de anticuerpo anti-hapteno con funcionalidades introducidas para la conjugación covalente

La derivatización de las secuencias humanizadas de VH y VL del anticuerpo anti-hapteno indicado anteriormente se llevó a cabo para generar compuestos que permitiesen el acoplamiento covalente de antígenos/haptenos al anticuerpo en una posición definida.

5 La estructura determinada experimentalmente de un fragmento Fab anti-digoxigenina unida a digoxigenina (3RA7) (Metz S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108:8194-8199, 2011) se utilizó para identificar las posiciones en las que las alteraciones permiten que se produzca una reacción de acoplamiento dirigida a sitio entre el anticuerpo y su antígeno/hapteno acomplexado. La estructura del fragmento Fab anti-biotina unido a biocitina (ver el Ejemplo 5) se utilizó para confirmar la posición correcta del residuo cisteína introducido para el fragmento de anticuerpo ligante de biotina y proporcionar la prueba de la aplicabilidad general de la posición o posiciones identificadas.

15 La posición que deben mutarse deben cumplir simultáneamente dos requisitos: (i) las posiciones de acoplamiento deben encontrarse próximas a la región de unión para utilizar el efecto de posicionamiento del antígeno/hapteno para el acoplamiento directo, e (ii) la mutación y posición de acoplamiento debe situarse de manera que la unión del antígeno/hapteno por sí sola no resulte afectada. Estos requisitos para encontrar una posición adecuada son de hecho 'contradictorias' una de otra debido a que el requisito (i) se satisface mejor con una posición próxima al sitio de unión, mientras que el requisito (ii) se consigue con más seguridad con posiciones alejadas del sitio de unión.

20 A pesar de estos requisitos virtualmente excluyentes, se identificaron posiciones que podían mutarse sin afectar a la localización del hapteno y que sin embargo permitían simultáneamente el acoplamiento covalente dirigido de un compuesto haptenilado.

25 La primera posición se localizaba en VH52b o VH53 según la numeración de Kabat, dependiendo de la longitud real de la RDC2 del anticuerpo respectivo. En la estructura del anticuerpo anti-digoxigenina, el hapteno se encuentra unido en un bolsillo profundo formado por residuos hidrofóbicos. Se utilizó un conjugado digoxigenina-Cy5 fluorescente en el presente estudio cristalográfico, en el que el fluoróforo, así como el conector entre la digoxigenina y Cy5, no se encontraban visibles en la estructura debido a una elevada flexibilidad y desorden resultante en el cristal. Sin embargo, el conector y Cy5 se encuentran unidos a O32 de la digoxigenina, lo que apunta en la dirección de la RDC2 de la cadena pesada. La distancia entre O32 (ver anteriormente) de la digoxigenina al C $\alpha$  del residuo aminoácido en la posición 52b según la numeración de Kabat era de aproximadamente 10,5 Å.

35 La sustitución del aminoácido en la posición VH52b/VH53 por Cys generó derivados de anticuerpo con secuencias de región variable de cadena pesada que se listan como SEC ID n° 20 y n° 28 para el anticuerpo anti-digoxigenina-VH52bC, en SEC ID n° 84 y n° 92 para el anticuerpo anti-teofilina-VH53C, en SEC ID n° 52 y n° 60 para el anticuerpo anti-biotina-VH53C, y SEC ID n° 108 para el anticuerpo anti-fluoresceína-VH52bC.

Una posición adicional que ha sido identificada como punto de modificación es la posición VH28 según la numeración de Kabat.

40 En consecuencia, los presentes inventores introdujeron una cisteína en la posición Kabat VH28. La sustitución del aminoácido en la posición VH28 por Cys generó derivados de anticuerpo con secuencias de región variable de cadena pesada que se listan como SEC ID n° 124 y n° 132 para el anticuerpo anti-digoxigenina-VH28, en SEC ID n° 156 y n° 164 para el anticuerpo anti-teofilina-VH28C, en SEC ID n° 140 y n° 148 para el anticuerpo anti-biotina-VH28C, y SEC ID n° 116 para el anticuerpo anti-fluoresceína-VH28C.

45 Se ha encontrado que una de dichas posiciones es una posición "universal", es decir, la posición es aplicable a cualquier anticuerpo y, de esta manera, no resulta necesario construir de cero cada vez que un nuevo anticuerpo (anti-hapteno) debe ser modificado, proporcionando la estructura cristalina y determinando la posición apropiada que permite el acoplamiento covalente con hapteno posicionado.

50 La mutación VH52bC o VH53C, respectivamente, según la numeración de Kabat de región variable de cadena pesada, podría utilizarse para cada anticuerpo de unión a hapteno analizado (anticuerpo anti-hapteno). Aunque los anticuerpos y estructuras de sus bolsillos de unión son bastante diversos, se ha demostrado que la mutación VH52bC/VH53C puede utilizarse para la unión covalente de antígenos/haptenos a anticuerpos ligantes de digoxigenina, biotina, fluoresceína, así como teofilina.

60 Las entidades de unión que están compuestas de dichas secuencias podrían expresarse y purificarse mediante cromatografía estándar de proteína A y de exclusión por tamaño (ver el Ejemplo 7). Las moléculas resultantes eran totalmente funcionales y conservaban afinidad para sus haptenos cognados de la misma manera que sus moléculas parentales no modificadas. Lo anterior se demostró mediante experimentos de resonancia del plasmón superficial (RPS) (ver el Ejemplo 9).

#### Ejemplo 7

Composición, expresión y purificación de anticuerpos anti-hapteno recombinantes

5 Se combinaron las regiones variables de anticuerpo anti-hapteno murino y humanizado con las regiones constantes de origen humano, formando anticuerpos quiméricos o humanizados monoespecíficos o biespecíficos.

10 La generación de anticuerpos anti-hapteno humanizados monoespecíficos y de anticuerpos anti-hapteno humanizados biespecíficos que se unen específicamente a un hapteno, así como a una diana no hapteno diferente (por ejemplo receptor tirosina quinasa o IGF-1R) requirió: (i) el diseño y la definición de secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para dichas moléculas, (ii) la expresión de dichas moléculas en células de mamífero en cultivo transfectadas, e (iii) la purificación de dichas moléculas a partir de los sobrenadantes de las células transfectadas. Estas etapas se llevaron a cabo tal como se ha indicado en el documento nº PCT/EP2011/074273.

15 En general, para generar un anticuerpo humanizado de la clase IgG que presenta la especificidad de unión del anticuerpo anti-hapteno murino (original), se fusionó la secuencia de VH humanizado en el mismo marco con el extremo N-terminal de CH1-bisagra-CH2-CH3 de una región Fc humana de la subclase IgG1. De manera similar, se fusionó la secuencia de VL humanizada en el mismo marco con el extremo N-terminal de la región constante CL kappa humana.

20 Para generar derivados de anticuerpo biespecífico que contenían la especificidad de unión a hapteno, así como especificidades para otras dianas, se fusionó el anticuerpo anti-hapteno, un fragmento scFv o Fab, en el mismo marco con el extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpos anteriormente indicados. En muchos casos, el scFv anti-hapteno aplicado se estabilizó adicionalmente mediante la introducción de un enlace disulfuro VH44-VL100 que ha sido descrito anteriormente (por ejemplo Reiter Y. et al., Nature Biotechnology 14:1239-1245, 1996).

Plásmidos de expresión

30 Los plásmidos de expresión que comprenden casetes de expresión para la expresión de las cadenas pesada y ligera se ensamblaron separadamente en vectores de expresión de célula de mamífero.

De esta manera, los segmentos génicos codificantes de los elementos individuales se unieron tal como se ha indicado de manera general anteriormente.

35 Se proporciona información general sobre las secuencias de nucleótidos de cadenas ligera y pesada humanas a partir de las cuales puede deducirse el uso de los codones, en: Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, publicación del NIH nº 91-3242.

40 La unidad de transcripción de la cadena ligera  $\kappa$  está compuesta de los elementos siguientes:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV\_h),
- un 5'UT sintético que incluye una secuencia de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- 45 - el ADNc de cadena ligera variable clonado dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donante de procesamiento y un único sitio de restricción NotI en el extremo 3',
- la región constante del gen  $\kappa$  humano genómico, incluyendo el intensificador de Ig- $\kappa$  de ratón del intrón 2 (Picard D. y Schaffner W., Nature 307:80-82, 1984), y
- la secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de inmunoglobulina  $\kappa$  humana.

50 La unidad de transcripción de la cadena ligera  $\gamma$ 1 está compuesta de los elementos siguientes:

- el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (CMV\_h),
- un 5'UT sintético que incluye una secuencia de Kozak,
- 55 - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada que incluye el intrón de secuencia de señal,
- el ADNc de cadena pesada variable monoespecífico clonado o la fusión biespecífica clonada de scFv-ADNc de cadena pesada variable dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donante de procesamiento y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3',
- 60 - la región constante del gen de cadena pesada  $\gamma$ 1 humana genómico, incluyendo el intensificador  $\mu$  de Ig de ratón (Neuberger M.S., EMBO J. 2:1373-1378, 1983) y
- la secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de inmunoglobulina  $\gamma$ 1 humana.

Aparte del casete de expresión de cadena ligera  $\kappa$  o cadena pesada  $\gamma 1$ , dichos plásmidos contienen:

- un gen de resistencia a la higromicina,
- un origen de replicación, oriP, procedente del virus Epstein-Barr (EBV),
- 5 - un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen  $\beta$ -lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina a *E. coli*.

#### Técnicas de ADN recombinante

10 La clonación se llevó a cabo utilizando técnicas de clonación estándares tales como las descritas en Sambrook et al., supra, 1999. Todos los reactivos biológicos moleculares se encuentran disponibles comercialmente (a menos que se indica lo contrario) y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

15 El ADN que contenía secuencias codificantes, mutaciones o elementos genéticos adicionales en Geneart AG, Regensburg.

Se determinaron las secuencias del ADN mediante secuenciación de doble cadena realizada en SequiServe (SequiServe GmbH, Alemania).

#### 20 Análisis de secuencias de ADN y de proteínas y gestión de los datos de secuencias

Se utilizó el programa Vector NTI Advance suite versión 9.0 para la creación, mapeado, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.

#### 25 Expresión de anticuerpos anti-hapteno y derivados

Los anticuerpos anti-hapteno se expresaron mediante transfección transitoria de células 293 renales embrionarias humanas (HEK293). Para ello, se construyeron las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos mono- o bi-específicos correspondientes en vectores de expresión que portaban marcadores de selección procarióticos y eucarióticos tal como se ha indicado de manera general anteriormente. Estos plásmidos se amplificaron en *E. coli*, se purificaron y posteriormente se aplicaron para las transfecciones transitorias. Se utilizaron técnicas estándares de cultivo celular para la manipulación de las células tal como se indica en Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. y Yamada K.M. (editores), John Wiley & Sonds, Inc.

35 Las células se cultivaron en medio de expresión apropiado a 37°C/8% de CO<sub>2</sub>. El día de la transfección se sembraron las células en medio fresco a una densidad de 1-2x10<sup>6</sup> células viables/ml. Los complejos de ADN con reactivos de transfección se prepararon en medio Opti-MEM I (Invitrogen, USA) utilizando 250  $\mu$ g de ADN plasmídico de cadena pesada y ligera en una proporción molar 1:1 para un volumen final de transfección de 250 ml. Se recolectaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos mono-específicos o bi-específicos 7 días después de la transfección, mediante centrifugación a 14.000xg durante 30 minutos, y se filtraron a través de un filtro estéril (0,22  $\mu$ m). Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta la purificación.

45 Para determinar la concentración de los anticuerpos y derivados en los sobrenadantes de cultivo celular, se realizó una cromatografía HPLC de afinidad. Para ello, el sobrenadante de cultivo celular que contenía anticuerpo mono- o bi-específico o derivados del mismo ligante de proteína A se aplicaron a una columna Poros A/20 de Applied Biosystems en una solución que comprendía KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mM y citrato sódico 100 mM, a pH 7,4. La elución a partir del material cromatográfico se llevó a cabo mediante aplicación de una solución que comprendía NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, a pH 2,5. Se utilizó un sistema de HPLC UltiMate 3000 (Dionex). Las proteínas eluidas se cuantificaron mediante absorbancia de UV y la integración de las áreas de los picos. Un anticuerpo IgG1 purificado sirvió como estándar.

#### 50 Purificación de anticuerpos anti-hapteno ligantes de digoxigenina, fluoresceína, teofilina o biotina

55 Siete días después de la transfección se recolectaron los sobrenadantes de las células HEK293. El anticuerpo recombinante (o derivados) contenidos en los mismos se purificaron a partir del sobrenadante en dos etapas mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200. Brevemente, se pasaron los sobrenadantes de cultivo clarificados que contenían el anticuerpo se aplicaron a una columna de proteína A MabSelectSuRe (5-50 ml) equilibrada con tampón PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no unidas se lavaron con tampón de equilibración. Los anticuerpos (o derivados) se eluyeron con tampón citrato 50 mM, pH 3,2. Las fracciones que contenían proteína se neutralizaron con 0,1 ml de tampón Tris 2 M, pH 9,0. A continuación, las fracciones de proteínas eluidas se agruparon, se concentraron con un dispositivo de filtración centrífuga de Amicon Ultra (valor de corte de PM: 30 K, Millipore) y se cargaron en una columna de filtración en gel 26/60 Superdex200

HiLoad (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, a pH 6,0. La concentración proteica de anticuerpos purificados y derivados se determinó a partir de la densidad óptica (DO) a 280 nm con la DO a 320 nm como corrección de fondo, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado a partir de la secuencia de aminoácidos según Pace et al., Protein Science 4:2411-2423, 1995. Se agruparon las fracciones de anticuerpo monoméricas, se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80°C. Se utilizó parte de las muestras para la analítica y caracterización posterior de las proteínas.

Se confirmó la homogeneidad de los anticuerpos mediante SDS-PAGE en presencia y en ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. Se utilizó el sistema de gel premoldeado NuPAGE® (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (geles de Tris-glicina al 4-20%).

Bajo condiciones reductoras se identificaron las cadenas polipeptídicas relacionadas con la IgG tras SDS-PAGE a tamaños moleculares aparentes análogos a los pesos moleculares calculados. Se analizaron los niveles de expresión de todos los constructos mediante proteína A. Los rendimientos promedio de proteína eran de entre 6 y 35 mg de proteína purificada por cada litro de sobrenadante de cultivo celular en dichos experimentos no optimizados de expresión transitoria.

### Ejemplo 8

#### Generación de compuestos haptencilados

Para la generación de compuestos para el acomplejamiento no covalente, así como para la conjugación (acomplejamiento covalente) resultó necesario: (i) acoplar el hapteno mediante conectores adecuados al compuesto (=carga), e (ii) para garantizar que el acomplejamiento se producía de una manera que permitía que el compuesto conservase su funcionalidad.

#### a) conjugados de hapteno-polipéptido:

Cualquier polipéptido puede derivatizarse N- o C-terminalmente o en una posición de cadena lateral con el conector portador del hapteno con la condición de que pueda introducirse un residuo reactivo, tal como un residuo cisteína, en el conector entre polipéptido y hapteno. Especialmente el polipéptido puede comprender residuos aminoácidos no naturales.

Se listan compuestos haptencilados ejemplares en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5.

compuesto	Figura
Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH <sub>2</sub> )	
Ac-Ile-Lys(N-propyl-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ))-Cys-4Abu-NH <sub>2</sub> -Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	10
DIG-3-cme-eda-Cy5	11
DIG-maleimida-Cy5	12
DIG-eda-Cys-Cy5	13
DIG-Ahx-Cys-Cy5	14
DIG-Cys-MR121	15
Ac-PYY(PEG3-Dig)	
Ac-Ile-Lys(N-(ácido digoxigenín-3-carboximetil-N-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico))-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	16
Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig)	
Ac-Ile-Lys(N-(digoxigenín-3-carboximetil-N-4-amino-butírico ácido acidil-N-cisteinil-N-12-amino-4,7,10-trioxododecanoico))-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	17
PEG3-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig)	
ácido 3,6,9-trioxo-decanoico acidil-Ile-Lys(N-propil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ))-Cys-Abu-Dig-3cme)-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	18
Dy636-eda-Btn	19
Dy636-Ser-Btn	20
Dy636-Cys-Btn	21
Cy5-Cys-Btn	22
Cy5-Ser-Btn	23
Ac-PYY(PEG2-Btn)	24



Ac-Ile-Lys(N-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH-Btn)-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	
Ac-PYY(PEG3-Cys-β-Ala-Btn) Ac-Ile-Lys(N-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-Cys-β-Ala-Btn)-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	25
Ac-PYY(PEG3-Ser-PEG2-Btn) Ac-Ile-Lys(N-arboxymetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-Ser-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH-Btn)-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	26
Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Btn) Ac-Ile-Lys(N-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-Cys-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH-Btn)-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	27
Ac-PYY(PEG3-Cys-4-Abu-5-Fluo) Ac-Ile-Lys(N-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-Cys-4Abu-5-Fluo)-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	28
Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo) Ac-Ile-Lys(N-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-Cys-carboximetil-(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH-5-Fluo)-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>	29
Abreviaturas: 4Abu = ácido 4-amino-butírico Ahx = ácido aminohexanoico Btn = biotínulo cme = carboximetilo Cy5 = indodicarboxianina, cianina-5 Dadoo = 1,8-diamino-3,6-dioxo-octano DCM = diclorometano Dig(OSu) = digoxigenín-3-carboximetil-N-hidroxisuccinimida Dy636 = fluoróforo eda = etilendiamina Fluo = 5-carboxi-fluoresceína HATU = hexafluorofosfato de 0-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio HFIP = 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol Mmt = 4-metoxitritilo MR121 = fluoróforo oxazina MTBE = éter butil-metílico NMM = N-metil-morfolina NMP = N-metil-2-pirrolidona PEG2 = ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico PEG3 = ácido 12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico O <sub>2</sub> O <sub>c</sub> = ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico Pip = piperidina Pqa = ácido 4-oxo-6-piperazín-1-il-4H-quinazolín-3-il)-acético TBTU = tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio TCEP = tris(2-cloroetil)fosfato TFE = 2,2,2-trifluoroetanol TIS = triisopropilsilano	

Un esquema del procedimiento de acoplamiento y los reactivos utilizados se muestra en las figuras 30, 31 y 32.

- 5 Un polipéptido ejemplar que se ha utilizado en la presente memoria era un derivado agonista del receptor del neuropéptido-2. Este polipéptido es un péptido tirosina tirosina o análogo de péptido pancreático YY PYY(3-36) corto tal como se informa en el documento nº WO 2007/065808. Se digoxigeniló mediante el residuo aminoácido lisina en la posición 2. El polipéptido PYY digoxigenilado se denomina DIG-PYY en el texto a continuación, con independencia de la unión de cadena lateral del polipéptido al residuo digoxigenina.
- 10 Otros compuestos ejemplares son los pigmentos fluorescentes no peptídicos Cy5, Dy636 y MR121. Estos compuestos pueden acoplarse con los sistemas conectores que contienen digoxigenina o biotina mediante reacción de NHS-éster.

15 i) Método general para la generación del precursor de conjugación de polipéptido derivado de PYY(3-36)

Protocolo estándar para derivados de PYY en un sintetizador múltiple automático:

Sintetizador: Sintetizador múltiple SYRO I (MultiSynTech GmbH, Witten) con sistema de agitación con vórtex  
Resina: 200 mg de TentaGel S RAM (0,25 mmoles/g), polímero RAPP, Tübingen, jeringa de plástico de 10 ml con frita de teflón como recipiente de reacción

Soluciones madre

Aminoácidos Fmoc: 0,5 M en DMF o NMP  
 Reactivo desbloqueante: Piperidina al 30% en DMF.  
 Activador: TBTU 0,5 M y HATU, respectivamente  
 Base: NMM al 50% en NMP

5 Acoplamiento:

Aminoácido Fmoc: 519 µl  
 Base: 116 µl  
 Activador: 519 µl  
 Tiempo de reacción: doble acoplamiento: 2x 30 min.

Desbloqueo de Fmoc:

10 Reactivo desbloqueante: 1200 µl  
 Tiempo de reacción: 5 min. + 12 min.

Lavado:

Solvente: 1.200 µl  
 Volumen: 1.300 µl  
 Tiempo de reacción: 5 x 1 min.

Corte final:

15 Reactivo de corte: 8 ml de TFA/tioanisol/tiocresol/TIS (95:2,5:2,5:3)  
 Tiempo de reacción: 4 h  
Tratamiento final: Se filtró la solución de corte y se concentró a 1-2 ml y el péptido se precipitó mediante la adición de MTBE. Se recolectó el sólido blanco mediante centrifugación, se lavó 2 veces con MTBE y se secó.

Resina Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S RAM (SEC ID n° 176)

20 El derivado polipéptido PYY(3-36) (denominado PYY) se obtuvo mediante síntesis en fase sólida automatizada de la secuencia peptídica unida a la resina Ac-IK(Mmt)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(tBu)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel-RAM. La síntesis peptídica se llevó a cabo en un sintetizador múltiple SYRO I (MultiSynTech GmbH, Witten) con un sistema de agitación con vórtex utilizando una reacción de Fmoc. Utilizando una resina TentaGel RAM (carga: 0,25 mmoles/g; Rapp Polymers, Alemania), se ensambló la secuencia peptídica  
 25 en ciclos iterativos mediante acoplamiento secuencial de los Fmoc-aminoácidos correspondientes (escala: 0,05 mmoles). En cada etapa de acoplamiento se eliminó el grupo Fmoc N-terminal mediante tratamiento de la resina (5 min. + 12 min.) con piperidina al 30% en dimetilformamida (DMF). Los acoplamiento se llevaron a cabo utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (0,25 mmoles) activados con TBTU (0,25 mmoles) en las posiciones 1, 13, 14 y 15 y NMT al 50% en NMP (doble acoplamiento 2x30 min. con vórtex). En todas las demás posiciones se utilizó  
 30 HATU (0,25 mmoles) y NMM al 50% en NMP como activador. Entre cada etapa de acoplamiento la resina se lavó 5x1 min. con DMF. Tras la síntesis del precursor lineal, se llevó a cabo la acetilación mediante reacción con DMF/DIPEA/Ac<sub>2</sub>O en 15 min. y lavado con DM, rindiendo Ac-IK(Mmt)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S resina RAM.  
 35 Para la eliminación del grupo Mmt, el péptido se trató con DCM/HFIP/TFE/TIS (6,5:2:1:0,5), 2X1 H, rindiendo el precursor parcialmente desbloqueado resina Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-

MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S RAM tras el lavado con DMF.

Ac-PYY(PEG3-Dig)/Ac-IK(PEG3-Dig)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub> (SEC ID n° 177)

5 Síntesis, ver también el documento n° WO 2012/093068.

10 A una solución del péptido Ac-IK(H<sub>2</sub>N-TEG)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY (100 mg, 40,6 µmoles) en agua (5 ml) se añadió digoxigenín-3-carboxi-metil-N-hidroxisuccinimida (26,6 mg, 48,8 µmoles) disuelta en NMP (1 ml). Se añadió trietilamina (13,6 ml, 97,6 µmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió digoxigenín-3-carboxi-metil-N-hidroxisuccinimida (13,3 mg, 24,4 µmoles) disuelta en NMP (0,5 ml) y trietilamina (6,8 µl, 48,8 µmoles) y la solución se agitó durante 15 h. El producto en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep. RP-18e de Merck, 100x25 mm), proporcionando el péptido Dig-PYY (29 mg, 10,0 µmoles, 25%) en forma de un sólido incoloro. Para la caracterización analítica del derivado péptido, los presentes inventores aplicaron las condiciones siguientes y se obtuvieron los datos siguientes: HPLC analítica:  $t_R=11,3$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para C<sub>140</sub>H<sub>207</sub>N<sub>35</sub>O<sub>32</sub>: 2892,4; observado: 964,9 [M+2H]<sup>2+</sup>, calculado: 965,1. Hasta el punto de acomplejamiento con el anticuerpo, los presentes inventores almacenaron el péptido digoxigenado en forma de liofilizado a 4°C. La figura 2C muestra la estructura de DIG-moPYY.

15 ii) Generación de polipéptidos derivados de PYY(3-36) digoxigenilados con un conector que contiene cisteína

Ac-IK(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub> (SEC ID n° 178)

25 Partiendo del precursor resina Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S RAM (SEC ID n° 176), se continuó la síntesis peptídica con las etapas siguientes:

30 acoplamiento doble manual con 66,5 mg (3 eq.). Ácido fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (PEG3-espaciador), 57,0 mg (3 equiv.). HATU y 16,7 µl (3 equiv.) NMM en 1,2 ml de DMF durante 2x30 min. Tras los lavados con DMF (5x1 min.) se escindió el grupo Fmoc con Pip al 30%/DMF y la resina se lavó con DMF utilizando el protocolo estándar.

35 Se llevaron a cabo los acoplamientos dobles siguientes de Fmoc-Cys(Trt)-OH y Fmoc-4-Abu-OH automáticamente en el sintetizador SYRO 1 mediante el protocolo tal como se indica en el protocolo estándar para derivados de PPY en un sintetizador múltiple automatizado. Finalmente, la resina se lavó con DMF, EtOH y MTBE, y se secó.

40 La escisión respecto de la resina se llevó a cabo con 8 ml de TFA/tioanisol/tiocresol/TIS (95:2,5:2,5:3) durante 4 h. La solución de corte se filtró y se concentró a 1-2 ml y el péptido se precipitó mediante la adición de MTBE. Se recolectó el sólido blanco mediante centrifugación, se lavó 2 veces con MTBE y se secó.

El producto en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa, proporcionando un sólido incoloro. Rendimiento: 28,0 mg.

Protocolo de purificación

HPLC: Shimadzu LC-8A with detector de UV-Vis SPD-6A  
 Solvente A: TFA al 0,05% en agua  
 Solvente B: TFA al 0,05% en acetonitrilo al 80%/agua  
 Columna: UltraSep ES, RP-18, 10 µm, 250x20 mm (SEPSERV, Berlin)  
 Caudal: 15 ml/min  
 Detección: 230 nm  
 Gradiente: 20-50% de B en 30 min.

45

Datos analíticos:

HPLC: Shimadzu LC-9A con detector de matriz de fotodiodos SPD-M6A  
 Solvente A: TFA al 0,05% en agua  
 Solvente B: TFA al 0,05% en acetonitrilo al 80%/agua  
 Columna: UltraSep ES, RP-18, 7 µm, 250x3 mm (SEPSERV, Berlin)  
 Caudal: 0,6 ml/min  
 Gradiente: 5-80% de B en 30 min.  
 EM: Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Shimadzu

AXIMA Linear (MALDI-TOF); los pesos moleculares se calculan como masas promedio

m/z: calculado para C<sub>122</sub>H<sub>185</sub>N<sub>37</sub>O<sub>28</sub>S = 2650,13; observado: 2650,3

Ac-IK(PEG3-Cys-4Abu-Dig)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub> (SEC ID n° 179)

5 A una solución de 15 mg de péptido Ac-IK(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-amida (SEC ID n° 180) en 50 µl de DMSO, se añadieron 250 µl de tampón PBS, pH 7,4, y la solución se agitó durante la noche. Se controló la formación de dímero mediante HPLC. Tras 18 h se había formado aprox. 90% del dímero.

10 A dicha solución se añadieron 7,3 mg de digoxigenín-3-carboxi-metil-N-hidroxisuccinimida (Dig-OSu) disueltos en 100 µl de DMF y la mezcla se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 16,9 mg adicionales de Dig-OSu disueltos en 100 µl de DMF y se agitaron durante 2 h. Se añadió una cantidad adicional de 6,9 mg en 100 µl de DMF y se agitó durante 18 h. Para la reducción del dímero, se añadió TCEP, se agitó durante 3 h y la solución se utilizó directamente para la purificación mediante HPLC de fase inversa preparativa.

Datos analíticos:

15 Las condiciones eran las mismas que las indicadas para la SEC ID n° 178  
Gradiente para la HPLC preparativa: 38-58% de B en 30 min.  
Rendimiento: 5,3 mg  
20 m/z: calculado para C<sub>147</sub>H<sub>219</sub>N<sub>37</sub>O<sub>34</sub>S = 3080,7; observado: 3079.8

PEG3-IK(PEG3-Cys-4Abu-Dig)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub> (SEC ID n° 180)

Síntesis automatizada en fase sólida de la secuencia de PYY unida a resina:

PEG2-IK(ivDde)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(tBu)R(Pbf)Q(Trt)-

25 MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel-resina RAM (SEC ID n° 181)

30 Se llevó a cabo la síntesis peptídica siguiendo protocolos establecidos (FastMoc, 0,25 mmoles) en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A de Applied Biosystems utilizando reacciones de Fmoc. Utilizando una resina TentaGel RAM (carga: 0,18 mmoles/g; Rapp Polymers, Alemania), se ensambló la secuencia peptídica en ciclos iterativos mediante acoplamiento secuencial de los Fmoc-aminoácidos correspondientes (escala: 0,25 mmoles). En cada etapa de acoplamiento se eliminó el grupo Fmoc N-terminal mediante tratamiento de la resina (3x2,5 min.) con piperidina al 20% en N-metilpirrolidona (NMP). Los acoplamientos se llevaron a cabo utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (1 mmol) y activados con HBTU/HOBt (1 mmol cada uno) y DIPEA (2 mmoles) en DMF (45 a 35 60 min. de agitación con vórtex). En las posiciones 2, 3 y 14, respectivamente, se incorporaron en la secuencia de síntesis los derivados de aminoácido Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Pqa-OH y Fmoc-N-Me-Arg(Mtr)-OH. Tras cada etapa de acoplamiento, los grupos amino no reaccionados recibieron una caperuza terminal mediante tratamiento con una mezcla de Ac<sub>2</sub>O (0,5 M), DIPEA (0,125 M) y HOBt (0,015 M) en NMP (10 min. de agitación con vórtex). Entre cada etapa la resina se lavó extensivamente con N-metil-pirrolidona y DMF. La incorporación de aminoácidos estéricamente impedidos se llevó a cabo en dobles acoplamientos automatizados. Con este fin, la resina se trató dos 40 veces con 1 mmol del bloque constructivo activado sin etapa de adición de caperuza entre ciclos de acoplamiento. Tras completar la secuencia diana, se eliminó el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en NMP y se acopló ácido 2-[2-(metoxietoxi)-etoxi]acético (4 mmoles) tras la activación con HBTU/HOBt (2 mmoles cada uno) y DIPEA (4 mmoles). A continuación, se transfirió la resina a un reactor de fase sólida con fritas para las manipulaciones 45 posteriores.

PEG2-IK(PEG3-Cys-Abu-NH<sub>2</sub>)-Pqa-RHYLNWVTRO-MeArg-Y-NH<sub>2</sub> (SEC ID n° 182)

50 Para la eliminación del grupo ivDe, la resina peptídica (PEG2-IK(ivDde)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(tBu)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel-resina RAM (SEC ID n° 181) se hinchó con DMF durante 30 min. y posteriormente se trató con una solución al 2% de hidrato de hidrazina en DMF (60 ml) durante 2 h. Tras lavar la resina extensivamente con isopropanol y DMF, se añadió una solución de ácido Fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (PEG3-espaciador) (887 mg, 2 mmoles), HBTU (2 mmoles), HOBt (2 mmoles) y se añadió diisopropiletilamina 2 M (2 ml, 4 mmoles) en DMF (3 ml), y la mezcla se agitó durante 3 h. La resina se lavó con DMF y se escindió el grupo Fmoc con una mezcla de piridina al 20% en DMF. A continuación, la 55 resina se trató con una mezcla de Fmoc-Cys(Trt)-OH (1,2 g, 2 mmoles), HBTU/HOBt (2 mmoles cada uno) y DIPEA (4 mmoles) durante 2 h. La resina se lavó con DMF y se escindió el grupo Fmoc con una mezcla de piridina al 20% en DMF y se acopló (2 h) ácido Fmoc-4-aminobutírico (0,65 g, 2 mmoles) activado con HBTU/HOBt (2 mmoles cada uno) y DIPEA (4 mmoles). Se eliminó el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en NMP y la resina se lavó

repetidamente con DMF. A continuación, la resina se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (19 ml: 0,5 ml: 0,5 ml) durante 2,5 h. Se filtró la solución de corte y el péptido se precipitó mediante la adición de éter diisopropílico (300 ml) frío (0°C), proporcionando un sólido incoloro, que se lavó repetidamente con éter diisopropílico. El producto en bruto se redisolvió en una mezcla de ácido acético/agua y se liofilizó y se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep. RP-18e de Merck, 100x25 mm).

HPLC analítica:  $t_R=8,6$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1% 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para  $C_{127}H_{195}N_{37}O_{31}S$ : 2768,3; observado: 1385,0  $[M+2H]^{2+}$ , calculado: 1385,1; 923,7  $[M+3H]^{3+}$ , calculado: 923,8; 693,1  $[M+4H]^{4+}$ , calculado: 693,1.

PEG2-IK(PEG3-Cys-4Abu-Dig)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub> (PEG2-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) (SEC ID nº 183)

A una solución de péptido PEG2-IK(PEG3-Cys-Abu-NH<sub>2</sub>)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub> (SEC ID nº 182, 4,1 mg, 1,48 µmoles) en DMF (3 ml) se añadió digoxigenín-3-carboxi-metil-N-hidroxisuccinimida (0,81 mg, 1,48 µmoles) disuelto en NMP (1 ml). Se añadió trietilamina (0,41 µl, 97,6 µmoles) en DMF y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. El producto en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep. RP-18e de Merck, 100x25 mm), proporcionando el péptido PEG3- Cys-4Abu-Dig (1,2 mg, 0,375 µmoles, 25%) en forma de un sólido incoloro.

HPLC analítica:  $t_R=10,2$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para  $C_{152}H_{229}N_{37}O_{37}S$ : 3198,8; observado: 1067,3  $[M+3H]^{3+}$ , calculado: 1067,3.

iii) Generación de polipéptidos derivados de PYY(3-36) con biotina o con biotina y conector que contiene cisteína

Ac-IK(PEG2-Biotín)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-amida/Ac-PYY(PEG2-Biot) (SEC ID nº 184)

Partiendo de la resina de péptido precursor común (SEC ID nº 176), el péptido se acopló manualmente 2 veces con 57,8 mg (3 equiv.) de ácido fmoc-8-amino-dioxaoctanoico (espaciador PEG2), 48,2 mg (3 equiv.). TBTU y 33,3 µl (6 equiv.) de NMM en 1,2 ml de DMF, 30 min. cada uno, y se lavó con DMF. Se escindió el grupo Fmoc con Pip al 30%/DMF aplicando el protocolo estándar indicado para SEC ID nº 176, la resina se lavó con DMF y se trató durante 2 h con una solución de biotina-OBt en NMP (48,9 mg de biotina (4 equiv.), 64,2 mg de TBTU (4 equiv.) y 44,4 µl de NMM (8 equiv.) en 1,2 ml de NMP, preactivación: 3 min.). Tras el lavado con DMF, EtOH y MTBE, se secó la resina con el péptido.

El corte final se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente. El producto en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de 22-52% de B en 30 min., proporcionando un sólido. Rendimiento: 42 mg.

Protocolo de purificación

HPLC: Shimadzu LC-8A with detector de UV-Vis SPD-6A  
 Solvente A: TFA al 0,05% en agua  
 Solvente B: TFA al 0,05% en acetonitrilo al 80%/agua  
 Columna: UltraSep ES, RP-18, 10 µm, 250x20 mm (SEPSERV, Berlin)  
 Caudal: 15 ml/min  
 Detección: 230 nm

Datos analíticos:

HPLC: Shimadzu LC-9A con detector de matriz de fotodiodos SPD-M6A  
 Solvente A: TFA al 0,05% en agua  
 Solvente B: TFA al 0,05% en acetonitrilo al 80%/agua  
 Columna: UltraSep ES, RP-18, 7 µm, 250x3 mm (SEPSERV, Berlin)  
 Caudal: 0,6 ml/min  
 Gradiente: 5-80% de B en 30 min.  
 EM: Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Shimadzu AXIMA Linear (MALDI-TOF); los pesos moleculares se calculan como masas promedio

---

m/z: calculado para C<sub>122</sub>H<sub>181</sub>N<sub>37</sub>O<sub>27</sub>S = 2630,10; observado: 2631.5

---

Ac-IK(PEG3-Cys-β-Ala-Biotín)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub>/Ac-PYY(PEG3-Cys-β-Ala-Biot) (SEC ID nº 185)

5 Partiendo de la resina con precursor Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S RAM (SEC ID nº 176), el péptido se acopló manualmente 2 veces durante 30 min. con 66,5 mg (3 equiv.) de Ácido fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (PEG3-espaciador), 57,0 mg (3 equiv.). HATU y 16,7 µl (3 equiv.) NMM en 1,2 ml de DMF. Tras el lavado con DMF, se escindió el grupo Fmoc con Pip al 30%/DMF y la resina se lavó con DMF aplicando el protocolo estándar.

10 Tras los dobles acoplamientos de Fmoc-Cys(Trt)-OH y Fmoc-β-Ala-OH realizados automáticamente en el sintetizador SYRO 1 aplicando el protocolo estándar, se añadió manualmente una solución de biotina-OBt en NMP (preparado a partir de 48,9 mg de biotina (4 equiv.), 64,2 mg de TBTU (4 equiv.) y 44,4 µl de NMM (8 equiv.) en 1,2 ml de NMP, preactivación: 3 min.) y se agitó a temperatura ambiente. Tras 2 h, la resina se lavó con DMF, EtOH y MTBE, y se secó.

15 El corte final se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente. El producto en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa tal como se ha indicado para SEC ID nº 184, proporcionando un sólido incoloro. Rendimiento: 41,4 mg

20 Datos analíticos:

Gradiente para la HPLC preparativa: 28-58% de B en 30 min.  
m/z: calculado para C<sub>131</sub>H<sub>197</sub>N<sub>39</sub>O<sub>30</sub>S<sub>2</sub> = 2862,4; observado: 2862.4

25 Ac-IK(PEG3-Cys-PEG2-Biotín)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub>/Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Biot) (SEC ID nº 186)

Partiendo de la resina con precursor Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S RAM (SEC ID nº 176), se continuó la síntesis peptídica con las etapas siguientes:

30 doble acoplamiento con Fmoc-PEG3-OH (aplicando el protocolo estándar),

doble acoplamiento con Fmoc-Cys(Trt)-OH (aplicando el protocolo estándar),

35 doble acoplamiento de Fmoc-PEG2-OH con 57,8 mg (3 equiv.) de ácido fmoc-8-amino-dioxaoctanoico (espaciador PEG2), 48,2 mg (3 equiv.). TBTU y 33,3 µl (6 equiv.) NMM en 1,2 ml de DMF, 2x 30 min. y biotilación con una solución de 48,9 mg de biotina (4 equiv.), 64,2 mg de TBTU (4 equiv.) y 44,4 µl de NMM (8 equiv.) en 1,2 ml de NMP (preactivación: 3 min.), acoplamiento individual: 2 h.

40 La escisión respecto de la resina, la purificación y el análisis se llevaron a cabo tal como se ha indicado para SEC ID nº 184. Rendimiento: 47,7 mg

Datos analíticos:

45 Las mismas condiciones que para SEC ID nº 184. Gradiente para la HPLC preparativa: 25-45% de B en 30 min.  
m/z: calculado para C<sub>134</sub>H<sub>203</sub>N<sub>39</sub>O<sub>32</sub>S<sub>2</sub> = 2936,5; observado: 2937.8

iv) Generación de polipéptidos derivados de PYY(3-36) con un conector que contiene fluoresceína o con un conector que contiene fluoresceína y cisteína

50 Ac-IK(PEG3-Cys-4-Abu-5-Fluo)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub>/Ac-PYY(PEG3-Cys-4-Abu-5-Fluo) (SEC ID nº 187)

55 Partiendo de la resina con precursor Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S RAM (SEC ID nº 176), se continuó con la síntesis peptídica análogamente a SEC ID nº 179. Para el marcaje, se añadió una solución de 54,2 mg de 5-carboxifluoresceína, 33,1 mg de HOBt y 35,6 µl de DIC en DMF y se agitó durante 18 h a temperatura ambiente.

La escisión respecto de la resina, la purificación y el análisis se llevaron a cabo tal como se ha indicado para SEC ID nº 179. Rendimiento: 41,6 mg

60 Datos analíticos:

Gradiente para la HPLC preparativa: 29-45% de B en 30 min.  
m/z: calculado para  $C_{143}H_{195}N_{37}O_{34}S$  = 3008,44; observado: 3007.2

5 Ac-IK(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo)-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub>/Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo) (SEC ID nº 188)

Partiendo de la resina con precursor Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S RAM (SEC ID nº 176), se continuó la síntesis peptídica con las etapas siguientes:

10 doble acoplamiento con Fmoc-PEG3-OH (aplicando el protocolo estándar),

doble acoplamiento con Fmoc-Cys(Trt)-OH (aplicando el protocolo estándar),

15 doble acoplamiento con Fmoc-PEG2-OH (ver SEC ID nº 186).

Para el marcaje, la resina con péptido se agitó durante 18 h con una solución de 56,7 mg de 5-carboxifluoresceína, 34,6 mg de HOBt y 37,3 µl de DIC en DMF. La escisión respecto de la resina, la purificación y el análisis se llevaron a cabo tal como se ha indicado para SEC ID nº 185. Rendimiento: 41,7 mg

20 Datos analíticos:

Gradiente para la HPLC preparativa: 34-64% de B en 30 min.  
m/z: calculado para  $C_{145}H_{199}N_{37}O_{36}S_1$  = 3068,5; observado: 3069.2

25 b) Pigmentos fluorescentes marcados con hapteno:

i) Generación de Cy5 digoxigenilado

Síntesis, ver el documento nº WO 2012/093068.

30 ii) Generación de Dig-Cys-MR121

En un matraz Erlenmeyer, se hinchó resina 1,2-diamino-propano-tritilo (250 mg, 0,225 mmoles, carga: 0,9 mmoles/g) con DMF (5 ml) durante 30 min. A continuación, se añadió a la resina una solución de Fmoc-Cys(Trt)-OH (395 mg, 0,675 mmoles) en DMF (2 ml) y una solución de HATU (433 mg, 1,2375 mmoles) y HOAt (164 mg, 1,2375 mmoles) en DMF (8 ml). A dicha suspensión se añadió DIPEA (385 µl, 2,25 mmoles) y la mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, se filtró y se lavó repetidamente con DMF. Tras la etapa de acoplamiento, los grupos amino no reaccionados recibieron una caperuza terminal mediante tratamiento con una mezcla de Ac<sub>2</sub>O (al 20%) en DMF, seguido de una etapa de lavado con DMF. La eliminación del grupo Fmoc N-terminal se llevó a cabo mediante tratamiento de la resina con piperidina (al 20%) en DMF durante 2 h. Después la resina se lavó intensamente con DMF e isopropanol y nuevamente DMF y seguidamente se trató con una solución de MR121 (25 mg, 0,05 mmoles) en DIPEA al 1% en DMF (10 ml) durante 16 h. Tras la filtración y el lavado con DMF, la resina se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (9 ml: 9 ml: 1 ml) durante 3 h. Se filtró la solución de corte, se concentró bajo presión reducida y el sólido resultante se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep. RP-18e de Merck, 100x25 mm) y se liofilizó. HPLC analítica:  $t_R$  = 7,7 min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1% 80:20, 25 min. A continuación, una parte de dicho intermediario (10,0 mg, 17,6 µmoles) se disolvió en DMF (1 ml) y se añadió una solución de digoxigenín-3-carboxi-metil-N-hidroxisuccinimida (9,6 mg, 17,6 µmoles) en DMF (1 ml) y trietilamina al 1% en DMF (2 ml) y la mezcla se agitó durante 16 h. Después se concentró la solución y el compuesto diana se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm). Rendimiento: 1,0 mg. HPLC analítica:  $t_R$  = 10,1 min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 996,3; observado: 995,8 [M]<sup>1+</sup>.

55 iii) Generación de DIG-Cys-Ahx-Cy5

En un matraz Erlenmeyer, se hinchó resina 1,2-diamino-propano-tritilo (250 mg, 0,225 mmoles, carga: 0,9 mmoles/g) con DMF (5 ml) durante 30 min. A continuación, se añadió a la resina una solución de Fmoc-Cys(Trt)-OH (395 mg, 0,675 mmoles) en DMF (2 ml) y una solución de HATU (433 mg, 1,2375 mmoles) y HOAt (164 mg, 1,2375 mmoles) en DMF (8 ml). A dicha suspensión se añadió DIPEA (385 µl, 2,25 mmoles) y la mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, se filtró y se lavó repetidamente con DMF. Tras la etapa de acoplamiento, los grupos amino no reaccionados recibieron una caperuza terminal mediante tratamiento con una mezcla de Ac<sub>2</sub>O (al 20%) en DMF,

seguido de una etapa de lavado con DMF. La eliminación del grupo Fmoc N-terminal se llevó a cabo mediante tratamiento de la resina con piperidina (al 20%) en DMF. A continuación, la resina se lavó intensamente con DMF e isopropanol y nuevamente DMF y después se trató con una solución de Cy5-Mono éster de NHS (25 mg, 0,0316 mmoles) en DIPEA al 1% en DMF (10 ml) durante 16 h. Tras la filtración y el lavado con DMF, la resina se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (9 ml: 9 ml: 1 ml) durante 3 h. Se filtró la solución de corte, se concentró bajo presión reducida y el sólido resultante se redisolvió en agua y se liofilizó. La purificación del intermediario se llevó a cabo mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido azul tras la liofilización. HPLC analítica:  $t_R=6,2$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1% 80:20, 25 min. A continuación, una parte de dicho intermediario (6,5 mg, 7,9  $\mu$ moles) se disolvió en DMF (1 ml) y se añadió una solución de Dig-Amcap-OSu (5,2 mg, 7,9  $\mu$ moles) y trietilamina al 1% en DMF (2 ml) y la mezcla se agitó durante 16 h. Después se concentró la solución y el compuesto diana se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm). Rendimiento: 3 mg. HPLC analítica:  $t_R=8,7$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 1360,0; observado: 1360,7 [M+H]<sup>1+</sup>.

#### iv) Generación de biotina-eda-Dy636

A una solución de hidrobromuro de biotina-etilendiamina (2,14 mg, 5,83  $\mu$ moles) en tampón K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 8,0, 500  $\mu$ l) se añadió una solución de Dy636-OSu (5 mg, 5,83  $\mu$ moles) en tampón de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 8,0, 500  $\mu$ l) y la mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, se filtró y el compuesto diana se aisló mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm). Tras la liofilización, se obtuvo el conjugado Dy636-etilendiamín-Bi en forma de un sólido incoloro (2,8 mg, 48%). HPLC analítica:  $t_R=8,5$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, agua + TFA al 0,1% → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1% 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para C<sub>50</sub>H<sub>65</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub>: 1006,3; observado: 1007,3 [M+H]<sup>+</sup>.

#### v) Generación de biotina-Ser-Dy636

##### Etapas 1: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Ser-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-NH<sub>2</sub>

Sobre una resina O-bis-(aminoetil)etilenglicol tritilo (176 mg, 0,125 mmoles, carga: 0,71 mmoles/g, Novabiochem) se acoplaron consecutivamente Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH (todos de Iris Biotech) y DMTr-D-biotina (Roche). Se llevó a cabo la síntesis peptídica siguiendo protocolos establecidos (FastMoc, 0,25 mmoles) en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A de Applied Biosystems utilizando reacciones de Fmoc (tal como se ha indicado para SEC ID n° 180).

Tras la síntesis, la resina se lavó intensamente con DMF, metanol y diclorometano, y se secó bajo vacío. A continuación, la resina se introdujo en un matraz Erlenmeyer y se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (9,5 ml: 250  $\mu$ l: 250  $\mu$ l) durante 2 h a temperatura ambiente. La solución de corte se filtró y el péptido se precipitó mediante la adición de éter diisopropílico (80 ml) frío (0°C), proporcionando un sólido incoloro, que se lavó repetidamente con éter diisopropílico. El producto en bruto se redisolvió en agua, se liofilizó y seguidamente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido incoloro tras la liofilización. Rendimiento: 56 mg (60 %). HPLC analítica:  $t_R=4,5$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,1 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 751,9; observado: 752,4 [M+H]<sup>+</sup>; 376,9 [M+2H]<sup>2+</sup>.

##### Etapas 2: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Ser-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-Dy-636 (Bi-Ser-Dy-636)

El péptido (5,3 mg, 7,0  $\mu$ moles) se disolvió en tampón de fosfato potásico 200 mM, pH 7,5 (583  $\mu$ l). Se disolvió Dy-636 éster de NHS (4 mg, 4,7  $\mu$ moles, Dyomics) en agua (583  $\mu$ l) y se añadió a la solución de péptido. La solución de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido azul tras la liofilización. Rendimiento: 3,9 mg (55 %). HPLC analítica:  $t_R=8,3$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 1472,8; observado: 1472,8 [M+H]<sup>+</sup>; 737,0 [M+2H]<sup>2+</sup>.

#### vi) Generación de biotina-Cys-Dy636



Etapa 1: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-NH<sub>2</sub>

5 Sobre una resina O-bis-(aminoetil)etilenglicol tritilo (352 mg, 0,25 mmoles, carga: 0,71 mmoles/g, Novabiochem) se acoplaron consecutivamente Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH (todos de Iris Biotech) y DMTr-D-biotina (Roche). Se llevó a cabo la síntesis peptídica siguiendo protocolos establecidos (FastMoc, 0,25 mmoles) en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A de Applied Biosystems utilizando reacciones de Fmoc (tal como se ha indicado para SEC ID nº 180).

10 Tras la síntesis, la resina se lavó intensamente con DMF, metanol y diclorometano, y se secó bajo vacío. A continuación, la resina se introdujo en un matraz Erlenmeyer y se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (9,5 ml: 250 µl: 250 µl) durante 2 h a temperatura ambiente. La solución de corte se filtró y el péptido se precipitó mediante la adición de éter diisopropílico (100 ml) frío (0°C), proporcionando un sólido incoloro, que se lavó repetidamente con éter diisopropílico. El producto en bruto se redisolvió en agua, se liofilizó y seguidamente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido incoloro tras la liofilización. Rendimiento: 79 mg (41 %). HPLC analítica: t<sub>R</sub>=5,3 min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,1 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 767,9; observado: 768,4 [M+H]<sup>+</sup>; 384,8 [M+2H]<sup>2+</sup>.

Etapa 2: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys(TNB)-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-NH<sub>2</sub>

25 El péptido (30 mg, 39 µmoles) se disolvió en tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5 (4 ml) y se añadió ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (77 mg, 195 µmoles). La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido amarillo tras la liofilización. Rendimiento: 31 mg (83 %). HPLC analítica: t<sub>R</sub>=5,4 min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 965,1; observado: 965,4 [M+H]<sup>+</sup>; 483,3 [M+2H]<sup>2+</sup>.

Etapa 3: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys(TNB)-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-Dy-636

35 El péptido protegido con TNB (1,35 mg, 1,4 µmoles) se disolvió en tampón de fosfato potásico 200 mM, pH 7,5 (291 µl). Se disolvió Dy-636 éster de NHS (1 mg, 1,2 µmoles, Dyomics) en agua (291 µl) y se añadió a la solución de péptido. La solución de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido azul tras la liofilización. Rendimiento: 1 mg (50 %). HPLC analítica: t<sub>R</sub>=9,0 min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 1686,0; observado: 1686,7 [M+H]<sup>+</sup>; 844,2 [M+2H]<sup>2+</sup>.

Etapa 4: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-Dy-636 (Bi-Cys-Dy-636)

45 El péptido protegido con TNB y péptido marcado con pigmento (1 mg, 0,6 µmoles) se disolvió en una mezcla de tampón de fosfato potásico 200 mM, pH 7,5 (250 µl) y agua (192 µl). Se añadió solución de hidrócloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (58 µl) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación se llevó a cabo mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido azul tras la liofilización. Rendimiento: 0,7 mg (79 %). HPLC analítica: t<sub>R</sub>=8,6 min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones 50 positivos): m/z: calculado para [M]: 1488,9; observado: 1488,6 [M+H]<sup>+</sup>; 745,1 [M+2H]<sup>2+</sup>.

vii) Generación de biotina-Cys-Cy5Etapa 1: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-NH<sub>2</sub>

55 Sobre una resina O-bis-(aminoetil)etilenglicol tritilo (352 mg, 0,25 mmoles, carga: 0,71 mmoles/g, Novabiochem) se acoplaron consecutivamente Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH (todos de Iris Biotech) y DMTr-D-biotina (Roche). Se llevó a cabo la síntesis peptídica siguiendo protocolos establecidos (FastMoc, 0,25 mmoles) en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A de Applied Biosystems utilizando reacciones de Fmoc (tal como se ha indicado para SEC ID nº 180).

60 Tras la síntesis, la resina se lavó intensamente con DMF, metanol y diclorometano, y se secó bajo vacío. A continuación, la resina se introdujo en un matraz Erlenmeyer y se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético,

agua y triisopropilsilano (9,5 ml: 250 µl: 250 µl) durante 2 h a temperatura ambiente. La solución de corte se filtró y el péptido se precipitó mediante la adición de éter diisopropílico (100 ml) frío (0°C), proporcionando un sólido incoloro, que se lavó repetidamente con éter diisopropílico. El producto en bruto se redisolvió en agua, se liofilizó y seguidamente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido incoloro tras la liofilización. Rendimiento: 79 mg (41 %). HPLC analítica:  $t_R=5,3$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,1 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 767,9; observado: 768,4 [M+H]<sup>+</sup>; 384,8 [M+2H]<sup>2+</sup>.

#### 10 Etapa 2: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys(TNB)-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-NH<sub>2</sub>

El péptido (30 mg, 39 µmoles) se disolvió en tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5 (4 ml) y se añadió ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (77 mg, 195 µmoles). La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido amarillo tras la liofilización. Rendimiento: 31 mg (83 %). HPLC analítica:  $t_R=5,4$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 965,1; observado: 965,4 [M+H]<sup>+</sup>; 483,3 [M+2H]<sup>2+</sup>.

#### 20 Etapa 3: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys(TNB)-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-Cy5

El péptido protegido con TNB (9,9 mg, 10,3 µmoles) se disolvió en tampón de fosfato potásico 200 mM, pH 7,5 (1.026 µl). Se disolvió Cy5-mono éster de NHS (6,5 mg, 8,2 µmoles, GE Healthcare) en agua (1.026 µl) y se añadió a la solución de péptido. La solución de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido azul tras la liofilización. Rendimiento: 10 mg (80 %). HPLC analítica:  $t_R=7,2$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 1603,9; observado: 1604,9 [M+H]<sup>+</sup>; 803,1 [M+2H]<sup>2+</sup>.

#### 30 Etapa 4: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Cys-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-Cy5 (Bi-Cys-Cy5)

El péptido protegido con TNB y péptido marcado con pigmento (10 mg, 6,1 µmoles) se disolvió en una mezcla de tampón de fosfato potásico 200 mM, pH 7,5 (1.522 µl) y agua (1.218 µl). Se añadió solución de hidrócloruro de tris(2-carboxietil)fosfina (304 µl) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La purificación se llevó a cabo mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido azul tras la liofilización. Rendimiento: 7,6 mg (86 %). HPLC analítica:  $t_R=6,4$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 1406,8; observado: 1406,8 [M+H]<sup>+</sup>; 704,0 [M+2H]<sup>2+</sup>.

#### viii) Generación de biotina-Ser-Cy5

##### 45 Etapa 1: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Ser-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-NH<sub>2</sub>

Sobre una resina O-bis-(aminoetil)etilenglicol tritilo (176 mg, 0,125 mmoles, carga: 0,71 mmoles/g, Novabiochem) se acoplaron consecutivamente Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-O<sub>2</sub>Oc-OH (todos de Iris Biotech) y DMTr-D-biotina (Roche). Se llevó a cabo la síntesis peptídica siguiendo protocolos establecidos (FastMoc, 0,25 mmoles) en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A de Applied Biosystems utilizando reacciones de Fmoc (tal como se ha indicado para SEC ID n° 180).

Tras la síntesis, la resina se lavó intensamente con DMF, metanol y diclorometano, y se secó bajo vacío. A continuación, la resina se introdujo en un matraz Erlenmeyer y se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (9,5 ml: 250 µl: 250 µl) durante 2 h a temperatura ambiente. La solución de corte se filtró y el péptido se precipitó mediante la adición de éter diisopropílico (80 ml) frío (0°C), proporcionando un sólido incoloro, que se lavó repetidamente con éter diisopropílico. El producto en bruto se redisolvió en agua, se liofilizó y seguidamente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido incoloro tras la liofilización. Rendimiento: 56 mg (60 %). HPLC analítica:  $t_R=4,5$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,1 % → acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 751,9; observado: 752,4 [M+H]<sup>+</sup>; 376,9 [M+2H]<sup>2+</sup>.

##### 60 Etapa 2: biotina-O<sub>2</sub>Oc-Ser-O<sub>2</sub>Oc-DADOO-Cy5 (Bi-Ser-Cy5)

El péptido (5,7 mg, 7,6  $\mu$ moles) se disolvió en tampón de fosfato potásico 200 mM, pH 7,5 (789  $\mu$ l). Se disolvió Cy5-mono éster de NHS (5 mg, 6,3  $\mu$ moles, GE Healthcare) en agua (789  $\mu$ l) y se añadió a la solución de péptido. La solución de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía TFA al 0,1% (columna Chromolith prep RP-18e de Merck, 100x25 mm), resultando en un sólido azul tras la liofilización. Rendimiento: 6 mg (58 %). HPLC analítica:  $t_R=6,1$  min. (Merck Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm, agua + TFA al 0,025 %  $\rightarrow$  acetonitrilo/agua + TFA al 0,023 %, 80:20, 25 min.); EM-IEP (modo de iones positivos): m/z: calculado para [M]: 1390,72; observado: 1391,2 [M+H]<sup>+</sup>.

### Ejemplo 9

#### Unión de anticuerpo anti-biotina humanizado recombinante a compuesto marcado con biotina (compuesto haptenilado)

Con el fin de determinar si el procedimiento de humanización y la posterior introducción de las mutaciones de cisteína han resultado en derivados que conservan una actividad de unión completa, se llevaron a cabo los experimentos siguientes.

Las propiedades de unión de los derivados de anticuerpo recombinante anti-biotina se analizaron mediante tecnología de interferometría de biocapas (TIB) utilizando un aparato Octet QK (Fortebio Inc.). Dicho sistema está bien establecido para el estudio de las interacciones entre moléculas. La tecnología de TIB se basa en la medición del patrón de interferencia de la luz blanca reflejada de la superficie de una punta biosensora y una referencia interna. La unión de las moléculas a la punta biosensora resulta en un desplazamiento del patrón de interferencia que puede medirse. Para analizar si el procedimiento de humanización indicado anteriormente reduce la capacidad del anticuerpo anti-biotina de unirse a la biotina, se compararon directamente las propiedades de las versiones quiméricas y humanizadas del anticuerpo en su capacidad de unirse a una proteína biotilada. Se llevaron a cabo estudios de unión mediante captura del anticuerpo anti-biotina sobre biosensores de captura de anticuerpo Fc anti-IgG<sub>hu</sub> (CAH). En primer lugar, se incubaron los biosensores en una solución de anticuerpo con una concentración de 0,5 mg/ml en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, durante 1 min. A continuación, los biosensores se incubaron durante 1 min. en 1x PBS, pH 7,4, hasta alcanzar una línea base estable. Se midió la unión mediante incubación de los biosensores recubiertos con anticuerpo en una solución que contiene proteína biotilada con una concentración de 0,06 mg/ml en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, durante 5 min. Se llevó a cabo un seguimiento de la disociación durante 5 min. en 1x PBS, pH 7,4. Las curvas de unión resultantes para los anticuerpos anti-biotina quiméricos y humanizados se compararon directamente.

La versión humanizada del anticuerpo mostró una unión igual o incluso mejor del antígeno biotilado que del anticuerpo quimérico. Lo mismo es cierto para el anticuerpo humanizado con la mutación de Cys en la posición de Kabat VH53. La proteína biotilada mostró una unión no específica residual a los biosensores que era reducida al recubrir los biosensores con herceptina, que no se une a la biotina. De esta manera, se conservó la funcionalidad del anticuerpo anti-biotina en su variante humanizada (que se define mediante las secuencias ilustradas en SEC ID n° 44 y n° 48, SEC ID n° 60 y n° 64).

#### Resonancia del plasmón superficial

Se llevó a cabo la medición mediante resonancia del plasmón superficial en un aparato BIAcore® T200 (GE Healthcare Biosciences AB, Suecia) a 25°C. Se acoplaron aproximadamente 4.300 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (10  $\mu$ g/ml de captura antihumano (IgG Fc) del kit de captura de anticuerpos humanos, BR-1008-39, GE Healthcare Biosciences AB, Suecia) en un chip CM3 (GE Healthcare, BR-1005-36) a pH 5,0 mediante la utilización del kit estándar de acoplamiento de aminas de GE Healthcare (BR-1000-50). El tampón de migración para la inmovilización era HBS-N (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, GE Healthcare, BR-1006-70). El tampón de migración y dilución para el estudio de unión siguiente era PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM, que incluía Tween-20 al 0,05%), pH 7,4. El anticuerpo anti-biotina humanizado se capturó mediante la inyección de una solución de 2 nM durante 60 s a un caudal de 5  $\mu$ l/min. Se diluyó ARNiP biotilado con PBS-T a concentraciones de entre 0,14 y 100 nM (serie de dilución 1:3). Se midió la unión mediante la inyección de cada concentración durante 180 s a un caudal de 30  $\mu$ l/min., tiempo de disociación: 600 s. Se regeneró la superficie mediante un lavado de 30 s con una solución de MgCl<sub>2</sub> 3 M a un caudal de 5  $\mu$ l/min. Los datos se evaluaron utilizando el software BIAevaluation (GE Healthcare Biosciences AB, Suecia). Se corrigieron las diferencias mayores del índice refractivo mediante sustracción de la respuesta obtenida de una superficie con Fc de anti-IgG humana. También se restaron las inyecciones de blanco (=doble referenciado) Para el cálculo de  $K_D$  y otros parámetros cinéticos, se utilizó el modelo de Langmuir 1:1.

Se llevó a cabo el análisis de unión cinético mediante resonancia del plasmón superficial (RPS) para el anticuerpo

anti-biotina humanizado, SEC ID nº 44 y nº 48 y para el anticuerpo anti-biotina VH53C, SEC ID nº 60 y nº 64. Se capturaron los anticuerpos anti-biotina a una concentración de 2 nM con anticuerpo Fc anti-IgG humana que se unió a un chip sensor CM3. Se registró la unión de ARNip biotinilado (Pm: 13.868 Da) a las concentraciones de 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3, 100 y 300 nM. Se llevaron a cabo las mediciones por duplicado. La  $K_D$  calculada para el anticuerpo anti-biotina humanizado y el anticuerpo anti-biotina humanizado VH53C eran de 0,633 nM y 0,654 nM, respectivamente.

#### Ejemplo 10

#### 10 Generación de complejos no covalentes de compuestos haptenilados con anticuerpos anti-hapteno.

##### Métodos generales:

15 La generación de complejos de anticuerpos anti-hapteno con compuestos haptenilados (=haptenos conjugado con una carga) resultará en complejos definidos y garantizará que el compuesto (=carga) en dichos complejos conserve su actividad. Para la generación de complejos de compuestos haptenilados con el anticuerpo anti-hapteno respectivo, el compuesto haptenilado se disolvió en H<sub>2</sub>O hasta una concentración final de 1 mg/ml. El anticuerpo se concentró hasta una concentración final de 1 mg/ml (4,85 µM) en tampón de histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH=6,0. Se mezcló la carga haptenilada y el anticuerpo en una proporción molar de 2:1 (compuesto a anticuerpo) pipeteando hacia arriba y hacia abajo, y se incubó durante 15 minutos a TA.

20 Alternativamente, el compuesto haptenilado se disolvió en DMF al 100% hasta una concentración final de 10 mg/ml. El anticuerpo se concentró hasta una concentración final de 10 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH=8,2. Se mezcló el compuesto haptenilado y el anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (compuesto a anticuerpo) pipeteando hacia arriba y hacia abajo, y se incubaron durante 60 minutos a TA y a 350 rpm.

##### Método ejemplar para la formación de complejos de pigmentos fluorescentes haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - complejo no covalente de digoxigenina-Cy5

30 Se utilizaron como componentes anticuerpo derivados humanizados y murinos de anticuerpo anti-digoxigenina o de anticuerpo biespecífico anti-digoxigenina. Para la generación de complejos de Cy5 digoxigenilado con los anticuerpos anti-digoxigenina, el conjugado de Cy5-digoxigenina se disolvió en PBS hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. El anticuerpo se utilizó a una concentración de 1 mg/ml (aproximadamente 5 µM) en un tampón compuesto de histidina 20 mM y NaCl 140 mM, pH 6. Se mezcló Cy5 digoxigenilado y anticuerpo en una proporción molar de 2:1 (Cy5 digoxigenilado a anticuerpo). Este procedimiento resultó en una preparación homogénea de complejos de composición definida.

40 La reacción de acomplejamiento puede monitorizarse determinando la fluorescencia (650/667 nm) del fluoróforo asociado a anticuerpo en una columna de exclusión por tamaño. Los resultados de dichos experimentos demuestran que el acomplejamiento únicamente se produce en el caso de que el anticuerpo contenga especificidades de unión para la digoxigenina. Los anticuerpos sin especificidades de unión para la digoxigenina no se unen al conjugado de digoxigenina-Cy5. Puede observarse una señal creciente para los anticuerpos bivaletnes anti-digoxigenina hasta una proporción de conjugado de digoxigenina-Cy5 a anticuerpo de 2:1. A continuación, las señales de fluorescencia dependientes de la composición alcanzan un nivel de saturación.

##### Método ejemplar para la formación de complejos de pigmentos fluorescentes haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - complejo de biotina-Cy5/anticuerpo anti-biotina quimérico (subclase IgG humana)

50 Para la generación de complejos de biotina-Cy5 derivatizado (biotina-Cys-Cy5) que contienen un conector cisteinilado, se disolvieron 0,16 mg de biotina-Cys-Cy5 en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo en una concentración de 10,1 mg/ml (aproximadamente 69 µM) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló biotina-Cys-Cy5 y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (biotina-Cys-Cy5 a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante SDS-PAGE tal como se indica en el Ejemplo 11a. La detección de fluorescencia se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 11a.

##### Método ejemplar para la formación de complejos de pigmentos fluorescentes biotinilados y anticuerpos anti-biotina - biotina-Ser-Cy5/anticuerpo anti-biotina humanizado:

60 Para la generación de complejos de biotina-Cy5 derivatizado (biotina-Ser-Cy5) que contienen un residuo de serina dentro del conector, se disolvieron 0,61 mg de biotina-Ser-Cy5 en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizaron 18,5 mg del anticuerpo anti-biotina humanizado en una concentración de 10 mg/ml (aproximadamente 69 µM) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló

biotina-Ser-Cy5 y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (biotina-Cys-Cy5 a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. A continuación, la muestra se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna de grado prep. de carga elevada Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) a un caudal de 1,5 ml/min. e histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, como fase móvil. Se recolectaron las fracciones de los picos y se analizaron mediante SDS-PAGE para la pureza. Se calculó la proporción de pigmento a anticuerpo mediante: (1) la medición de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 280 nm (proteína) y de 650 nm (Cy5), (2) la utilización de la fórmula:  $A_{650}$  de proteína marcada/ $\epsilon(\text{Cy5})$ \*concentración de proteína (M) = moles de pigmento por cada mol de proteína, en la que  $\epsilon(\text{Cy5})=250.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $A_{650}$  del complejo=47,0 y la concentración de la proteína era de 86,67  $\mu\text{M}$ . La proporción resultante de pigmento a moléculas de anticuerpo era de 2,17, lo que sugiere que todos los paratopos del anticuerpo se encontraban saturados con moléculas de biotina-Cy5.

Método ejemplar para la formación de complejos de polipéptidos haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - complejo de digoxigenina-PYY(3-36)/anticuerpo anti-digoxigenina

Para la generación de complejos no covalentes de polipéptidos digoxigenilados con un anticuerpo anti-digoxigenina, se disolvió el anticuerpo derivado de hibroma murino (liofilizado de  $\text{KPO}_4$  10 mM, NaCl 70 mM, pH 7,5) en 12 ml de agua y se dializó frente a una solución que comprendía histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, rindiendo 300 mg ( $2 \times 10^{-6}$  moles) en 11 ml de tampón ( $c=27,3 \text{ mg/ml}$ ). Se añadió conjugado de digoxigenina-PYY(3-36) (11,57 mg,  $4 \times 10^{-6}$  moles, 2 eq.) en 4 porciones de 2,85 mg en 1 h y se incubó durante otra hora a temperatura ambiente. Tras completar la reacción de acomplejamiento, se purificaron los complejos mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 200 26/60 GL (320 ml) en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, a un caudal de 2,5 ml/min. El complejo eluido se recolectó en fracciones de 4 ml, se agruparon y se esterilizaron a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ , proporcionando 234 mg del complejo a una concentración de 14,3 mg/ml. De una manera similar, para la generación de complejos del anticuerpo anti-digoxigenina humanizado, el anticuerpo se ajustó a una concentración de 10,6 mg/ml (9,81 mg,  $6,5 \times 10^{-8}$  moles en 0,93 ml) en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Se añadieron 0,57 mg= $1,97 \times 10^{-7}$  moles=3,03 eq. del polipéptido digoxigenilado (DIG-PYY) a la solución del anticuerpo en forma de liofilizado. El polipéptido y el anticuerpo se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. El exceso de polipéptido se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superose 6 10/300 GL en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, a un caudal de 0,5 ml/min. El complejo eluido se recolectó en fracciones de 0,5 ml, se agruparon y se esterilizaron a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ , proporcionando 4,7 mg del complejo a una concentración de 1,86 mg/ml.

El complejo resultante de polipéptido haptencilado-anticuerpo anti-hapteno se definió como molécula de tipo IgG monomérica por la aparición de un único pico en una cromatografía de exclusión por tamaño. El complejo resultante se definió como molécula de tipo IgG monomérica que portaba dos derivados digoxigenina-PYY por cada molécula de anticuerpo. Se confirmó la composición definida de dichos complejos peptídicos mediante cromatografía de exclusión por tamaño, que también indicó la ausencia de agregados de proteínas. La composición definida (y proporción 2:1 de polipéptido a proteína) de dichos complejos peptídicos biespecíficos se confirmó adicionalmente mediante CET-DLMA (cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión lumínica multiángulo). Para el análisis de CET-DLMA, se aplicaron 100 a 500  $\mu\text{g}$  de la muestra respectiva a una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 10/300 GL a un caudal de entre 0,25 y 0,5 ml/min. con 1xPBS, pH 7,4, como fase móvil. Se detectó la dispersión lumínica con un detector Wyatt miniDawn TREOS/QELS; se midió el índice refractivo con un detector Wyatt Optilab rEX. Se analizaron los datos resultantes utilizando el software ASTRA (versión 5.3.4.14). Los resultados de los análisis de CET-DLMA proporcionaron información sobre la masa, radio y tamaño del complejo. A continuación, se compararon dichos datos con los del anticuerpo no acomplejado correspondiente. Los resultados de dichos experimentos demuestran que la exposición de la PYY digoxigenilada al anticuerpo anti-digoxigenina resultan en complejos que contienen dos derivados digoxigenina-PYY por cada molécula de anticuerpo. De esta manera, la PYY digoxigenilada puede acomplejarse con el anticuerpo anti-digoxigenina en sitios definidos (región de unión) y con una estequiometría definida.

La caracterización del complejo mediante estudios de resonancia del plasmón superficial proporciona pruebas adicionales de que la reacción de acomplejamiento generada definió y acomplejó por completo las moléculas. El anticuerpo anti-digoxigenina puede unirse al chip de RPS, resultando en incrementos de la señal. La adición posterior de conjugado digoxigenina-PYY resulta en incrementos adicionales de la señal, hasta que todos los sitios de unión se encuentren totalmente ocupados. Bajo estas condiciones, la adición de más digoxigenina-PYY no incrementa adicionalmente la señal. Lo anterior indica que la reacción de acomplejamiento es específica y que las señales no están causadas por la pegajosidad no específica del polipéptido digoxigenilado.

Método ejemplar para la formación de complejos de polipéptidos haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - complejo de Ac-PYY-PEG3-Cys- $\beta$ -Ala-Biot /anticuerpo quimérico anti-biotina

Para la generación de complejos no covalentes de polipéptido PYY biotencilado que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,19 mg de Ac-PYY-PEG3-Cys- $\beta$ -Ala-Biot en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se

utilizó el anticuerpo a una concentración de 10,7 mg/ml (aproximadamente 73  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY-PEG3-Cys- $\beta$ -Ala-Biot y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY-PEG3-Cys- $\beta$ -Ala-Biot a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El complejo resultante se definió como molécula de tipo IgG monomérica por la aparición de un único pico en una cromatografía de exclusión por tamaño (95% monómero). El complejo resultante se analizó adicionalmente mediante SDS-PAGE y posterior análisis de transferencia western. Se mezclaron 10  $\mu$ g del complejo con 4x tampón para muestras LDS (Invitrogen) y se incubaron a 95°C durante 5 min. La muestra se aplicó a un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 4-12% (NuPAGE, Invitrogen) que se operó durante 35 min. a 200 V y 120 mA. Las moléculas que se separaron en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (tamaño de poro: 0,2  $\mu$ m, Invitrogen) durante 40 min. a 25 V y 160 mA. La membrana se bloqueó en leche desnatada al 1% (p/v) en 1x PBST (1x PBS + Tween-20 al 0,1%) durante 1 h a TA. La membrana se lavó 3x durante 5 min. en 1x PBST y posteriormente se incubó con un conjugado de estreptavidina-POD (2.900 U/ml, Roche) que se utilizó a una dilución de 1:2.000. La detección de la estreptavidina-POD unida a biotina sobre la membrana se llevó a cabo utilizando un sustrato de transferencia western LumiLight (Roche).

#### Método ejemplar para la formación de complejos de polipéptidos haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - complejo químico de Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2-Biot /anticuerpo anti-biotina

Para la generación de complejos no covalentes de polipéptido PYY biotencilado que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,16 mg de Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2-Biot en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó el anticuerpo a una concentración de 10,7 mg/ml (aproximadamente 73  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2-Biot y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2-Biot a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El complejo resultante se definió como 63% molécula de tipo IgG monomérica y 37% de agregados solubles diméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El complejo resultante se analizó adicionalmente mediante SDS-PAGE y posterior análisis de transferencia western. Se mezclaron 10  $\mu$ g del complejo con 4x tampón para muestras LDS (Invitrogen) y se incubaron a 95°C durante 5 min. La muestra se aplicó a un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 4-12% (NuPAGE, Invitrogen) que se operó durante 35 min. a 200 V y 120 mA. Las moléculas que se separaron en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (tamaño de poro: 0,2  $\mu$ m, Invitrogen) durante 40 min. a 25 V y 160 mA. La membrana se bloqueó en leche desnatada al 1% (p/v) en 1x PBST (1x PBS + Tween-20 al 0,1%) durante 1 h a TA. La membrana se lavó 3x durante 5 min. en 1x PBST y posteriormente se incubó con un conjugado de estreptavidina-POD (2.900 U/ml, Roche) que se utilizó a una dilución de 1:2.000. La detección de la estreptavidina-POD unida a biotina sobre la membrana se llevó a cabo utilizando un sustrato de transferencia western LumiLight (Roche).

#### Método ejemplar para la formación de complejos de polipéptidos haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - complejo químico de Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo) /anticuerpo anti-fluoresceína

Para la generación de complejos no covalentes de polipéptido PYY conjugado con fluoresceína que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,33 mg de Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo) en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó el anticuerpo a una concentración de 9,99 mg/ml (aproximadamente 68  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo) y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo) a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El complejo resultante se definió como 76% molécula de tipo IgG monomérica y 24% de agregados solubles diméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño. El complejo resultante se analizó adicionalmente mediante SDS-PAGE y posteriormente se realizó la detección de la fluorescencia relacionada con la fluoresceína en el gel de poliacrilamida. Se mezclaron 8  $\mu$ g del complejo con 4x tampón para muestras LDS (Invitrogen) y se incubaron a 95°C durante 5 min. Se registró la fluorescencia relacionada con la fluoresceína utilizando un dispositivo Lumimager F1 (Roche) a una longitud de onda de excitación de 645 nm.

#### Ejemplo 11

#### Generación de conjugados covalentes definidos de pigmentos o polipéptidos haptencilados con un anticuerpo anti-hapteno VH52bC/VH53C en presencia de agentes redox.

#### Método ejemplar para la formación de complejos de pigmentos fluorescentes haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - Dig-Cys-Ahx-Cy5/anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC

La generación de conjugados covalentes de anticuerpos anti-hapteno y pigmentos fluorescentes haptencilados que contenían un conector de cisteínas resultó en conjugados definidos en los que se formaba un puente disulfuro en una posición específica entre VH52bC en la RDC2 del anticuerpo anti-hapteno y la cisteína en el conector entre el hapteno y el pigmento fluorescente. La reacción de conjugación se llevó a cabo en presencia de agentes redox. Se disolvió Dig-Cys-Ahx-Cy5 en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. La solubilización resultó facilitada por la adición

gota a gota de ácido acético al 10% (v/v). La concentración final se ajustó a 0,4 mg/ml. El anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, se llevó a una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó un anticuerpo anti-digoxigenina como control y se trató de la misma manera que el anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC. Se mezclaron 4,7 nmoles de cada anticuerpo con 2,5 equivalentes molares de Dig-Cys-Ahx-Cy5. Lo anterior se llevó a cabo mediante la adición de 11,7 nmoles de dicha sustancia en 4 porciones (2,9 nmoles cada una) cada 15 min. Entre estas adiciones, se incubaron las muestras a 25°C bajo agitación suave. Tras la adición de la última porción, se transfirieron 0,64 nmoles de cada complejo de anticuerpo-Dig-Cys-Ahx-Cy5 a tampón que contenía los reactivos redox siguientes: DTE (ditioeritrol) 3 mM + GSSG (glutación oxidado) 10 mM, DTE 0,3 mM + GSSG 1 mM y DTE 0,03 mM + GSSG 0,1 mM. Todas las muestras se incubaron durante 15 min. bajo dichas condiciones. Tras la incubación, se dividieron las muestras por la mitad (0,34 nmoles cada una) y se prepararon para la electroforesis en gel SDS. Para ello, se añadió 4x tampón para muestras LDS (Invitrogen). Para cada muestra se preparó también una versión reducida mediante la adición de 10x agente reductor de muestras NuPAGE (Invitrogen). Todas las muestras se incubaron a 70°C durante 5 min. antes de la electroforesis en un gel de poli-acrilamida Bis-Tris al 4-12% (NuPAGE, Invitrogen) con 1x tampón MOPS (Invitrogen). Se detectó la fluorescencia relacionada con Cy5 en el gel utilizando un dispositivo Lumilmager F1 (Roche) a una longitud de onda de excitación de 645 nm. Tras la detección de la fluorescencia, el gel se tiñó con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). Se muestran los geles en la figura 8.

Se mostró la formación de enlaces disulfuro específicos de sitio para el anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC (fig. 8, geles en la parte superior, carriles 1 A-C) con una señal de fluorescencia de fondo baja al utilizar anticuerpo anti-digoxigenina sin una cisteína en RDC2 (carriles 2 A-C). Las señales de fondo en las reacciones de control puede explicarse por el acoplamiento de Dig-Cys-Ahx-Cy5 a cisteínas que normalmente participan en la formación de enlaces disulfuro entre cadenas de anticuerpo. Las cantidades crecientes de reactivos redox reducen sustancialmente los puentes disulfuro que conectan las cadenas pesada y ligera de anticuerpo, produciendo principalmente anticuerpos  $\frac{3}{4}$  (-1x CL), dímeros de CP (-2x CL) y anticuerpos  $\frac{1}{2}$  (1x CP + 1x CL). En el fondo del gel podía detectarse fluorescencia de Dig-Cys-Ahx-Cy5 que no se encontraba unido covalentemente al anticuerpo. Los geles en la parte inferior de la fig. 8 muestran que, con la reducción de las muestras, no era detectable fluorescencia relacionada con Cy5 próxima a las cadenas pesada y ligera de anticuerpo, indicando que el enlace covalente en efecto estaba formado por un puente disulfuro. Las tinciones de Coomassie de cada gel muestran que la cantidad total de proteína en cada carril era igual.

#### Método ejemplar para la formación de conjugados de pigmentos fluorescentes haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - Dig-Cys-Cy5/anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC

Se disolvió Dig-Cys-Cy5 en HCl 8,3 mM, DMF al 10% (v/v) hasta una concentración final de 3,25 mg/ml. El anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, se llevó a una concentración de 15 mg/ml. Se utilizó el anticuerpo anti-digoxigenina como control y se trató de la misma manera que el anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC. Se mezclaron 13,3 nmoles de cada anticuerpo con 2 equivalentes molares de Dig-Cys-Cy5 a una concentración final de anticuerpo de 10 mg/ml en presencia de GSH (glutación reducido) 1 mM y GSSG (glutación reducida) 5 mM. Lo anterior se llevó a cabo mediante la adición de 26,6 nmoles de dicha sustancia en 2 porciones cada 5 min. Entre estas adiciones, se incubaron las muestras a TA bajo agitación suave. Tras la adición de la última porción, las muestras se incubaron durante 1 h a TA. La eficiencia de la reacción de acoplamiento se evaluó mediante SDS-PAGE y posterior registro de la señal de fluorescencia relacionada con Cy5. Se prepararon 5, 10 y 20  $\mu$ g de cada muestra para la SDS-PAGE. Para ello, se añadió 4x tampón para muestras LDS (Invitrogen). Todas las muestras se incubaron a 70°C durante 5 min. antes de la electroforesis en un gel de poli-acrilamida Bis-Tris al 4-12% (NuPAGE, Invitrogen) con 1x tampón MOPS (Invitrogen). Se detectó la fluorescencia relacionada con Cy5 en el gel utilizando un dispositivo Lumilmager F1 (Roche) a una longitud de onda de excitación de 645 nm. Tras la detección de la fluorescencia, el gel se tiñó con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen).

#### Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - PEG3-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) /anticuerpo anti-digoxigenina humanizado VH52bC

Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con digoxigenina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 1,4 mg de PEG3-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo en una concentración de 10 mg/ml (aproximadamente 68  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, GSH 1 mM, GSSG 5 mM, pH 8,2. Se mezcló PEG3-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) y anticuerpo en una proporción molar de 2:1 (PEG3-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 100 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó 43% de la especie detectada como anticuerpo acoplado con 2 moléculas de polipéptido; 46% era anticuerpo acoplado con 1 molécula de polipéptido y 11% se identificó como anticuerpo no acoplado.

#### Ejemplo 12

Generación de conjugados covalentes definidos de pigmentos y polipéptidos haptencilados con un anticuerpo anti-hapteno VH52bC/VH53C en ausencia de agentes redox.

5 Para la generación de anticuerpo anti-hapteno/polipéptido haptencilado covalente o conjugados unidos mediante disulfuro de pigmento haptencilado resulta necesario: (i) acoplar el hapteno (por ejemplo digoxigenina, fluoresceína, biotina o teofilina) mediante conectores que contienen un grupo reactivo adecuado (tal como, por ejemplo, cisteína o maleimida) con el polipéptido o pigmento que permite que el polipéptido resulte expuesto sobre la superficie del anticuerpo y por lo tanto conserve su actividad, e (ii) generar conjugados específicos de sitio covalente de los polipéptidos haptencilados con el anticuerpo anti-hapteno con una mutación de cisteína (=anticuerpo  
10 VH52bC/VH53C) en el que la actividad biológica del polipéptido se conserva, e (iii) llevar a cabo la reacción en ausencia de un agente reductor con el fin de evitar la reducción de los puentes disulfuro entre cadenas del anticuerpo.

Método general:

15 La generación de complejos de anticuerpos anti-hapteno con compuestos haptencilados resultará en conjugados con estequiometría definida y garantizará que el compuesto en dichos conjugados conserve su actividad. Para la generación de conjugados de compuestos haptencilados con el anticuerpo anti-hapteno respectivo, el compuesto haptencilado se disolvió en DMF al 100% hasta una concentración final de 10 mg/ml. El anticuerpo anti-hapteno  
20 VH52bC/VH53C se llevó hasta una concentración de 10 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH=8,2. Se mezcló el compuesto haptencilado y el anticuerpo anti-hapteno VH52bC/VH53C en una proporción molar de 2,5:1 (compuesto a anticuerpo) pipeteando hacia arriba y hacia abajo, y se incubaron durante 60 minutos a TA y bajo agitación a 350 rpm.

25 Un polipéptido conjugado con el hapteno mediante un conector que contiene cisteína se denomina hapteno-Cys-polipéptido o polipéptido-Cys-hapteno posteriormente. El polipéptido puede presentar un extremo N-terminal libre o un extremo N-terminal con caperuza, por ejemplo con un grupo etilo (Ac-polipéptido-Cys-hapteno) o un residuo de PEG (PEG-polipéptido-Cys-hapteno).

30 Un pigmento fluorescente conjugado con el hapteno mediante un conector que contiene cisteína se denomina pigmento-Cys-hapteno o hapteno-Cys-pigmento posteriormente.

Método ejemplar para la formación de conjugados de pigmentos fluorescentes haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - Dig-Cys-Ahx-Cy5/anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC

35 Las muestras se prepararon exactamente tal como se indica en el Ejemplo 11a, con la diferencia de que los complejos de anticuerpo-Dig-Cys-Ahx-Cy5 se transfirieron a tampón que no contienen compuestos redox, GSSG (glutación oxidado) 0,1 mM o GSSG 1 mM. Los geles de poliacrilamida de fluorescencia escaneada y teñidos con Coomassie resultantes se muestran en la figura 9. Las tres condiciones muestran una especificidad similar para la  
40 formación de puente disulfuro específico de sitio (figura 9, geles superiores, carriles 1 A-C) con un nivel bajo de reacciones de fondo (figura 9, carriles 2 A-C). Lo anterior confirma que la formación del enlace disulfuro puede llevarse a cabo sin necesidad de agentes reductores. Lo anterior estabiliza significativamente el anticuerpo/reduce la desintegración del anticuerpo, ya que sólo se detectan cantidades residuales de anticuerpos  $\frac{3}{4}$  (-1x CL), dímeros de CP (-2x CL) y anticuerpos  $\frac{1}{2}$  (1x CP + 1x CL) en comparación con el Ejemplo 11.

Método ejemplar para la formación de conjugados de pigmentos fluorescentes haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - Dig-Cys-Cy5/anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC

50 Las muestras se prepararon exactamente tal como se indica en el Ejemplo 11b, con la diferencia que 13,3 moles de anticuerpo se mezclaron con 2 equivalentes molares de Dig-Cys-Cy5 a una concentración de anticuerpo final de 10 mg/ml en ausencia de agentes redox.

Método ejemplar para la formación de conjugados de pigmentos fluorescentes haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - Biotina-Cys-Cy5/anticuerpo quimérico anti-biotina VH53C

55 Para la generación de conjugados de Cy5 derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,16 mg de biotina-Cys-Cy5 en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo anti-biotina VH53C en una concentración de 9,7 mg/ml (aproximadamente 68  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló biotina-Cys-Cy5 y anticuerpo en una proporción  
60 molar de 2,5:1 (Ac-biotina-Cys-Cy5 a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante SDS-PAGE tal como se indica en el Ejemplo 11a. La detección de fluorescencia se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 11a.



Método ejemplar para la formación de conjugados de pigmentos fluorescentes haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - Biotina-Cys-Cy5/anticuerpo humanizado anti-biotina VH53C

5 Para la generación de conjugados de Cy5 derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,16 mg de biotina-Cys-Cy5 en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo anti-biotina humanizado VH53C a una concentración de 7,4 mg/ml (aproximadamente 51  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló biotina-Cys-Cy5 y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-biotina-Cys-Cy5 a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante SDS-PAGE tal como se indica en el Ejemplo 11a. La detección de fluorescencia se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 11a.

Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) /anticuerpo anti-digoxigenina humanizado VH52bC

15 Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con digoxigenina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 2,4 mg de Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) en acetato al 20 % hasta una concentración de 5 mg/ml. Se utilizaron 10 mg del anticuerpo anti-digoxigenina humanizado VH52bC (68,4 nmoles) a una concentración de 19,5 mg/ml (aproximadamente 133  $\mu$ M) en un tampón compuesto de histidina 20 mM, EDTA 140 mM, pH 6,0. Se mezcló Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) y anticuerpo en una proporción molar de 2:1 (Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-Dig) a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 100 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó 7,4% de la especie detectada como anticuerpo acoplado con 2 moléculas de polipéptido; 40% era anticuerpo acoplado con 1 molécula de polipéptido y 52% se identificó como anticuerpo no acoplado.

Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - Ac-PYY(PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot)/anticuerpo quimérico anti-biotina VH53C

30 Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,19 mg de Ac-PYY(PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot) en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo anti-biotina quimérico VH53C a una concentración de 9,7 mg/ml (aproximadamente 67  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY[PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot] y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY[PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot] a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó 87,7% de la especie detectada como anticuerpo acoplado con 2 moléculas de polipéptido y 12,3% era anticuerpo acoplado con 1 molécula de polipéptido.

Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Biot)/anticuerpo quimérico anti-biotina VH53C

40 Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,16 mg de Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Biot) en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo anti-biotina quimérico VH53C a una concentración de 9,9 mg/ml (aproximadamente 68  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Biot] y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY[PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot] a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó que 100% de la especie detectada era anticuerpo acoplado con 2 moléculas de péptido.

Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - Ac-PYY(PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot)/anticuerpo humanizado anti-biotina VH53C

50 Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,06 mg de Ac-PYY(PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot) en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 0,8 mg del anticuerpo anti-biotina humanizado VH53C a una concentración de 9 mg/ml (aproximadamente 62  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY[PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot] y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY[PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot] a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó 62,2% de la especie detectada como anticuerpo acoplado con 2 moléculas de polipéptido; 33,9% era anticuerpo acoplado con 1 molécula de polipéptido y 3,9% se identificó como anticuerpo no acoplado.

Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptenilados y anticuerpos anti-hapteno - Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Biot)/anticuerpo humanizado anti-biotina VH53C

Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado,

se disolvieron 0,08 mg de Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Biot) en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 0,8 mg del anticuerpo anti-biotina humanizado VH53C a una concentración de 9 mg/ml (aproximadamente 62  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Biot] y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY[PEG3-Cys- $\beta$ Ala-Biot] a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó 71,4% de la especie detectada como anticuerpo acoplado con 2 moléculas de polipéptido; 26 % era anticuerpo acoplado con 1 molécula de polipéptido y 2,5% se identificó como anticuerpo no acoplado.

#### Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Fluo)/anticuerpo anti-fluoresceína VH52bC

Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,33 mg de Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Fluo] en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo anti-fluoresceína VH52bC a una concentración de 9,3 mg/ml (aproximadamente 63  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Fluo] y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Fluo] a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó 95 % de la especie detectada como anticuerpo acoplado con 2 moléculas de polipéptido y 5 % era anticuerpo acoplado con 1 molécula de polipéptido.

#### Método ejemplar para la formación de conjugados de polipéptidos haptencilados y anticuerpos anti-hapteno - Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-Fluo)/anticuerpo anti-fluoresceína VH28C

Para la generación de conjugados de polipéptido PYY derivatizado con biotina que contiene un conector cisteinilado, se disolvieron 0,33 mg de Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Fluo] en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizó 1 mg del anticuerpo anti-fluoresceína VH28C a una concentración de 9,5 mg/ml (aproximadamente 63  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Fluo] y anticuerpo en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-PYY[PEG3-Cys-PEG2-Fluo] a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitó a 350 rpm. El conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Se identificó que 100% de la especie detectada era anticuerpo acoplado con 2 moléculas de péptido.

#### Ejemplo 13

##### Generación de complejos covalentes de teofilina-anticuerpo anti-teofilina

Para evaluar la formación de complejos covalentes de anticuerpo que utilizan teofilina y anticuerpos ligantes de teofilina como sistema de reconocimiento de hapteno. Se generó teofilina-Cys-Cy5 como carga fluorescente, aplicando de manera general las tecnologías de síntesis y purificación que se han descrito para digoxigenina-Cys-Cy5 o biotina-Cys-Cy5, con la excepción de que el hapteno se ha intercambiado en lugar de la teofilina (ver el Ejemplo 8 y las figuras 13, 14 y 22). La composición del derivado teofilina-Cys-Cy5 que había sido sintetizado se muestra en la figura 43a. Para demostrar la formación de un disulfuro covalente, se generaron anticuerpos ligantes de teofilina que contenían un Cys diseñado en la posición 54 o 55 de la región variable de cadena pesada (anticuerpo anti-teofilina-Cys). La pureza de dichos anticuerpos se muestra ejemplarmente para la variante Y54C en la figura 43b. Estos derivados de anticuerpo se acomplejaron con teofilina-Cys-Cy5 y posteriormente se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras tal como se indica en el Ejemplo 12. Bajo condiciones no reductoras, se detectó Cy5 unido mediante disulfuro acomplejado con anticuerpo anti-teofilina a partir de su fluorescencia asociada a cadena P dentro del gel de la manera indicada en el Ejemplo 12. Lo anterior se ilustra en la figura 43c, que demuestra que los complejos covalentes entre anticuerpos se habían formado como consecuencia de la reacción simple de carga de la misma manera que los disulfuros que se observaron al utilizar digoxigenina, fluoresceína o biotina como hapteno. Estos complejos se disociaron tal como se esperaba con la reducción, es decir, liberaron la carga respecto de la cadena P únicamente al reducir el disulfuro (figura 43c).

#### Ejemplo 14

##### Generación de complejos covalentes de hapteno-anticuerpo bajo condiciones similares a in vivo y pruebas de la formación de disulfuro dirigida in vivo

Para evaluar la formación de los complejos covalentes de hapteno-anticuerpo bajo condiciones similares a las in vivo, se incubaron anticuerpos-Cys anti-biotina a 37°C en suero murino con biotina-cys-Cy5 durante 60 min. Después, el anticuerpo se capturó a partir del suero murino mediante proteína A. Seguidamente los anticuerpos capturados se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras tal como se indica en el Ejemplo 12. Se detectó Cy5 acomplejado con anticuerpo unido mediante disulfuro a partir de su fluorescencia asociada a cadena P dentro del gel de la misma manera que se indica en el Ejemplo 12. La figura 44 demuestra que

se forman complejos covalentes entre anticuerpos en el suero a 37°C, es decir, bajo condiciones similares a las condiciones in vivo. Estos complejos se disociaron tal como se esperaba con la reducción, es decir, liberaron la carga respecto de la cadena P únicamente al reducir el disulfuro (figura 44). La observación de que tras el posicionamiento del hapteno, puede formarse un enlace disulfuro dirigido entre anticuerpo y carga incluso en presencia de suero, ya que éste contiene una cantidad elevada de proteínas, péptidos y otros compuestos (que pueden interferir con las reacciones de formación de disulfuro). La observación de que tras el posicionamiento de hapteno puede formarse un enlace disulfuro dirigido entre anticuerpo y carga en el suero a 37°C también abre la posibilidad de aplicar este sistema de modulación FQ en un contexto pre-diana: aplicación separada de anticuerpo y carga hapteno, seguido del ensamblaje in vivo de complejos de anticuerpos y la posterior formación de disulfuro.

Para evaluar adicionalmente las aplicaciones 'pre-diana' in vivo potenciales, se determinó la farmacocinética de biotina-Cy5 bajo condiciones pre-diana mediante tecnología de obtención de imágenes ópticas no invasivas de los ojos de los animales, tal como se indica en el Ejemplo 18. En estos experimentos, se determinó la presencia de Cy5 de manera no invasiva mediante la obtención de imágenes ópticas de los ojos de los animales, las cuales revelaron la fluorescencia de Cy5 en los capilares. Los valores de fluorescencia mediada por Cy5 que detectaron los presentes inventores en el ojos de los ratones 10 min. después de la inyección de biotina-Cy5 se fijaron en un valor de 100%, y los valores de fluorescencia medidos en puntos temporales posteriores se expresaron respecto al mismo. En el presente experimento, se aplicó 1 mg de anticuerpo (anticuerpo anti-biotina o anticuerpo-Cys anti-biotina (=mutante de Cys de anticuerpo anti-biotina) 24 horas antes de la inyección de biotina-Cy5 y el inicio de la obtención de imágenes oculares. El grupo de control no fue preinyectado con el anticuerpo anti-biotina.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 45: la inyección de biotina-Cy5 en los animales que no habían recibido anticuerpo preinyectado se eliminó con una semivida sérica reducida y bajos niveles de exposición (rombos). Los niveles de suero y la semivida de biotina-Cy5 que se inyectaron en los animales 24 horas antes de la inyección de anticuerpo anti-biotina (sin mutación de Cys) se incrementaron en gran medida. Lo anterior demuestra que el anticuerpo captura su antígeno (con la carga) en la circulación y prolonga la semivida en suero del antígeno (y de manera similar de la carga conjugada). El nivel y semivida séricas relativas de biotina-Cys-Cy5 inyectado en los animales preinyectado 24 horas antes con el anticuerpo-Cys anti-biotina (es decir, un anticuerpo que contenía la mutación de Cys tal como se informa en la presente memoria para el acoplamiento covalente de carga) se incrementaron incluso más. En estas muestras, los niveles relativos de Cy5 no sólo eran superior que los del compuesto no acomplexado, sino también eran superiores a los niveles de Cy5 acomplexado (pero no unido mediante disulfuro). De esta manera, las cargas unidas mediante disulfuro acomplexadas con hapteno (que se forman bajo condiciones pre-diana in vivo) resultan más estables en la circulación y pueden alcanzar niveles de exposición más altos que las cargas acomplexadas no covalentes.

#### Ejemplo 15

##### Los polipéptidos en conjugados y en complejos con anticuerpo anti-hapteno conservan funcionalidad

Los presentes inventores habían demostrado anteriormente que los polipéptidos que forman parte de conjugados no covalentes de hapteno-polipéptido y en complejos con anticuerpos anti-hapteno conservan funcionalidad (documentos n° WO2011/003557, n° WO2011/003780 y n° PCT/EP2011/074273). Con el fin de demostrar que los péptidos acoplados conservan funcionalidad también tras el acoplamiento covalente con disulfuro, se comparó la actividad biológica de polipéptidos acomplexados con anticuerpo anti-digoxigenina y sus conjugados con disulfuro con anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC.

La funcionalidad terapéuticamente deseada de los péptidos derivados de PYY es la unión e interferencia con la señalización de su receptor cognado NPY2. La señalización mediante el receptor de NPY2 participa y/o regula procesos metabólicos.

Con el fin de evaluar si el acomplexamiento o conjugación con SS del polipéptido Dig-PYY con el anticuerpo anti-digoxigenina o la conjugación del polipéptido Dig-Cys-PYY con el anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC, respectivamente, afecta a su actividad, los presentes inventores evaluaron su capacidad de inhibir la acumulación de AMPc estimulada por forskolina en las células HEK293 que expresaban el receptor NPY<sub>2</sub> (ensayo de AMPc).

La Tabla 6 a continuación muestra los resultados de los ensayos de AMPc que se llevaron a cabo para evaluar la actividad biológica de PYY(3-36), su análogo modificado específico de receptor de Y2 moPYY, su variante de Dig acomplexado con anticuerpo y su derivado Dig-Cys conjugado con disulfuro.

Tabla 6.

	día 1	día 2
muestra	EC <sub>50</sub> [nM]	EC <sub>50</sub> [nM]
PYYwt	0,09	0,1

moPYY	0,14	0,15
Anticuerpo anti-digoxigenina VH52bC conjugado con moPYY(Cys-Dig)-disulfuro	5,38	5,33
Complejo de moPYY(Dig)-anticuerpo anti-digoxigenina	9,26	12,55

Para el ensayo de agonista de AMPc, se utilizaron los materiales siguientes: placa de 384 pocillos; kit de cribado de AMPc Tropix, sistema ELISA de AMPc (Applied Biosystems, n° de cat. T1505, CS 20000), forskolina (Calbiochem n° de cat. 344270), células: HEK293/hNPY2R; medio de crecimiento: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), suero de feto bovino al 10% (FBS, Gibco), inactivado por calor; penicilina/estreptomicina al 1% (Pen 10.000 unidades/ml: Strep. 10.000 mg/ml, Gibco), 500 µg/ml de G418 (geneticina, Gibco n° de cat. 11811-031) y medio de siembra en placa: DMEM7F12 sin rojo fenol (Gibco); FBS al 10% (Gibco, n° de cat. 10082-147), inactivado por calor; penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco, n° de cat. 15140-122), 500 µg/ml de G418 (geneticina, Gibco n° de cat. 11811-031).

Para llevar a cabo el ensayo, el primer día se descartó el medio y las células de la monocapa se lavaron con 10 ml de PBS por cada matraz (T225). Tras decantar con PBS, se utilizaron 5 ml de VERSENE (Gibco, n° de cat. 1504006) para desprender las células (5 min. a 37°C). El matraz se golpeó suavemente y se agrupó la suspensión celular. Se enjuagó cada matriz con 10 ml de medio de siembra en placa y se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min. Se agrupó la suspensión y se realizó un recuento. La suspensión se resuspendió en medio de siembra en placa a una densidad de  $2,0 \times 10^5$  células/ml para HEK293/NPY2R\_h. Se transfirieron 50 microlitros de células (HEK293/NPY2R\_h - 10.000 células/pocillo) en la placa de 384 pocillos utilizando un dispensador multi-gota. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C. El segundo día, se comprobaron las células para confluencia de 75% a 85%. Se dejó que el medio y los reactivos alcanzasen la temperatura ambiente. Antes de preparar las diluciones, se dejó que la solución madre de compuesto estimulador en sulfóxido de dimetilo (DMSO, Sigma, n° de cat. D2650) a 32°C durante 5 a 10 min. Se prepararon diluciones en DMEM/F12 con 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM (IBMX, Calbiochem, n° de cat. 410957) y 0,5 mg/ml de BSA. La concentración de DMSO final en el medio de estimulación era de 1,1% con una concentración de forskolina de 5 µM. Se eliminó el medio celular con una inversión suave de la placa celular sobre un papel absorbente. Se introdujeron 50 µl de medio de estimulación en cada pocillo (cada concentración se preparó en cuatro réplicas). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y se comprobaron las células bajo un microscopio para la toxicidad. Tras 30 min. de tratamiento, se descartó el medio de estimulación y se añadieron 50 µl/pocillo de tampón de lisis de ensayo (proporcionado en el kit Tropix). Las placas se incubaron durante 45 min. a 37°C. Se transfirieron 20 µl del lisado desde placas de estimulación a placas de anticuerpo prerrecubiertas (384 pocillos) del kit Tropix. Se añadieron 10 µl de conjugado AP y 20 µl de anticuerpo anti-AMPc. Se incubaron las placas a temperatura ambiente bajo agitación durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron 5 veces con tampón de lavado, 70 µl por pocillo de cada lavado. Se golpearon suavemente las placas para secarlas. Se añadieron 30 µl/pocillo de solución de sustrato CSPD/Sapphire-II RTU/intensificador y se incubaron durante 45 minutos a TA (agitación). Se midió la señal durante 1 s/pocillo en un luminómetro (VICTOR-V).

Los resultados de estos ensayos (Tabla 6) muestran que el derivado peptídico modificado moPYY presentaba una actividad despreciable inferior a la de la PYY de tipo salvaje. El valor de  $IC_{50}$  del ensayo de AMPc era de 0,09 nM para la PYY de tipo salvaje y de 0,14 nM para el análogo modificado. La conjugación covalente con disulfuro resultó en una ligera reducción de la actividad biológica. El valor  $IC_{50}$  era de entre 5 y 36 nM para el conjugado. Inesperadamente, el conjugado covalente con disulfuro es 2 veces más activo que el complejo no covalente con un valor de  $IC_{50}$  de 10,91 nM.

#### Ejemplo 16

#### Estabilidad sérica de complejos de Cy5 biotinilado con anticuerpo anti-biotina humanizado en comparación con conjugados covalentes de Cy5 biotinilado con anticuerpo humanizado anti-biotina VH53C

El objetivo de la tecnología indicada de modificación de péptidos es mejorar la aplicabilidad terapéutica de los péptidos. Las restricciones principales de la aplicación terapéutica de los péptidos actualmente son la estabilidad limitada in vivo y/o la corta semivida en suero y la rápida eliminación. Los parámetros FQ de los conjugados de anticuerpo con fluoróforos se determinaron in vivo y se compararon con la FQ de los complejos no covalentes de anticuerpo-fluoróforo. Por lo tanto, (i) el anticuerpo anti-biotina VH53C se conjugó covalentemente con el fluoróforo biotinilado Biot-Cys-Cy5, (ii) se generó un complejo no covalente del anticuerpo anti-biotina con el fluoróforo biotinilado Biot-Cy5, (iii) los complejos conjugados covalentemente y no covalentemente se aplicaron a animales y (iv) las concentraciones séricas de los compuestos durante el tiempo en estos animales se midieron mediante la determinación de la fluorescencia de Cy5 (A650) y la del anticuerpo correspondiente mediante un método ELISA que detecta específicamente el anticuerpo humanizado.

#### Procedimiento experimental

Con el fin de analizar la influencia sobre los parámetros FQ del acomplejamiento con anticuerpo de un sustrato

fluorescente pequeño, se aplicaron 13 nmoles de conjugado de Cy5-biotina/anticuerpo anti-biotina VH53C humanizado o del compuesto de anticuerpo acomplejado no covalentemente correspondiente, o del compuesto fluorescente solo, en histidina 20 mM/NaCl 140 mM, pH 6,0, a seis ratones (cepa NRM1) hembra para cada sustancia. Se recolectaron muestras de sangre de aproximadamente 0,1 ml tras los puntos temporales siguientes:

5 0,08 h, 4 h y 48 h para los ratones 1, 2 y 3 en un primer grupo, y 0,08 h, 24 h y 72 h para los ratones 1, 2 y 3 en un segundo grupo. Se obtuvieron muestras de suero de por lo menos 50  $\mu$ l tras 1 h a TA bajo centrifugación (9.300 x g, 3 min., 4°C). Las muestras se almacenaron a -80°C.

Con el fin de determinar la cantidad de compuesto en el suero en puntos temporales dados, se utilizaron las propiedades fluorescentes de Cy5 siguientes: Cy5 related fluorescence in serum samples were measured in 120  $\mu$ l quartz cuvettes at room temperature using a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian). La longitud de onda de excitación era 640 nm y la emisión se midió a 667 nm. Las muestras de suero se diluyeron en 1x PBS hasta alcanzar un intervalo apropiado de intensidad de emisión. Se utilizó suero sanguíneo de un ratón no tratado en la misma dilución en 1x PBS que la muestra respectiva como sonda de blanco y no mostró ninguna señal fluorescente.

La figura 34 muestra los resultados de un análisis que utiliza conjugados covalentes, complejos no covalentes y hapteno-Cy5 no acomplejado. Los datos se muestran como niveles relativos (%) de fluorescencia mediada por Cy5 normalizada respecto a los niveles séricos (pico) 5 min. después de la inyección. Para un compuesto de peso molecular relativamente pequeño, la biotina-Ser-Cy5 no acomplejada desaparece rápidamente del suero. Una hora después de la inyección, sólo 6% de la fluorescencia aplicada y detectable tras 5 minutos en el suero todavía era detectable. En puntos temporales posteriores, 2 h, 4 h y 24 h después de la inyección, la señales mediadas por Cy5 no eran detectables.

Del compuesto acomplejado con anticuerpo cuatro horas después de la inyección, todavía aprox. 50% de la fluorescencia que había sido aplicada (los niveles a los 5 min. se fijaron a 100%) era detectable en el suero. Los niveles de fluorescencia mediados por Cy5 también eran detectables en puntos temporales posteriores con aprox. 22% de los valores a 5 min. detectables a las 2 h y aprox. 12% era detectable 48 h después de la inyección y 8% todavía era detectable tras 72 h. El compuesto conjugado con anticuerpo muestra una semivida in vivo significativamente más prolongada que el compuesto acomplejado con anticuerpo. Cuatro horas después de la inyección, el 58% de la fluorescencia que había sido aplicada (los niveles a los 5 min. se fijaron a 100%) todavía era detectable en el suero (un factor 1,16 más alto que para el compuesto acomplejado con anticuerpo). Tras 24 h, se detectó 35% (factor 1,6); tras 48 h, 31% (factor 2,6) y tras 72 h, 26% (factor 3,3) de la fluorescencia mediada por Cy5, en el suero. La reducción comparable de la fluorescencia para compuestos acomplejados y conjugados en las primeras 24 h de los experimentos puede explicarse por la distribución temprana, que es similar para complejos y conjugados. Tras 24 h, la estabilidad in vivo de los compuestos conjugados con anticuerpo es responsable de la diferencia.

Con el fin de determinar la cantidad de anticuerpo IgG humano en el suero en puntos temporales dados, se utilizó el principio de ensayo siguiente: se capturaron anticuerpos IgG1 humanos en muestras de suero sobre una fase sólida (placa de microtitulación Maxisorb®, NUNC-Immuno™) recubierta con un anticuerpo IgG monoclonal anti-cadena kappa humana. Las muestras de suero se diluyeron 1:10<sup>5</sup> y 1:10<sup>6</sup> y se añadieron 100  $\mu$ l de dichas diluciones a los pocillos. Tras la incubación, los pocillos se lavaron 3 veces con 300  $\mu$ l de PBS/Tween-20 al 0,05% cada uno. La detección de anticuerpos IgG humanos se llevó a cabo añadiendo en primer lugar 100  $\mu$ l de IgG anti-dominio C<sub>H</sub>1 humano digoxigenilado en el extremo C-terminal a una concentración de 0,25  $\mu$ g/ml. Tras lavar 3 veces con 300  $\mu$ l de 1x PBS/Tween-20 al 0,05% cada lavado, se añadieron 100  $\mu$ l de fragmento Fab de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano picante (PRP) a una concentración de 25 mU/ml. Finalmente, se añadieron 100  $\mu$ l de ABTS® por pocillo. Tras 30 min. de incubación a temperatura ambiente, se midió la extinción (DO) a 405 nm y a 492 nm [405/492] en un lector ELISA comercial de placas de microtitulación (por ejemplo Tecan Sunrise).

La figura 34 muestra los niveles séricos de Bio-Cy5, así como los niveles séricos de IgG humana en ratones tratados con complejos y conjugados de anticuerpo-biotina-Cy5. Los datos se muestran como niveles relativos (%) de IgG humana respecto a los niveles séricos (pico) 5 min. después de la inyección. Los niveles relativos de IgG humana de tanto los complejos como los conjugados de anticuerpo-hapteno concuerdan con la fluorescencia relativa medida para los conjugados de anticuerpo-hapteno. De esta manera, el compuesto biotina-Cys-Cy5 muestra una estabilidad in vivo similar a la del anticuerpo al que se encuentra conjugado, lo que implica que los conjugados de anticuerpo-hapteno permanecen intactos in vivo. Lo anterior claramente no es el caso para los complejos de anticuerpo-hapteno, para los que la fluorescencia relativa mediada por Cy5 se reduce más rápidamente que los niveles séricos relativos de IgG humana. Lo anterior implica que los complejos liberan la carga durante el tiempo in vivo.

En resumen, la estabilidad in vivo de los compuestos haptenilados se incrementa significativamente cuando se encuentran unidos a un anticuerpo anti-hapteno. Sin embargo, los complejos de anticuerpo-hapteno no son completamente estables in vivo, ya que la reducción de los niveles séricos de hapteno-Cy5 es más rápida que la reducción de los niveles séricos de anticuerpo. Éste no es el caso para los conjugados de anticuerpo-hapteno-Cy5,

que muestran un comportamiento in vivo similar al de los anticuerpos IgG normales.

Cinética sérica de dig-peptido (comparación entre complejo no covalente y conjugado covalente)

5 Con el fin de analizar la influencia sobre los parámetros FQ del acomplejamiento con anticuerpo y la conjugación con anticuerpo del polipéptido digoxigenilado, se aplicaron 32,1 nmoles del polipéptido o del polipéptido correspondiente  
acomplejado no covalentemente con anticuerpo en histidina 20 mM/NaCl 140 mM, pH 6,0, a seis ratones (cepa  
NRMI) hembra para cada sustancia. Los ratones presentaban un peso de 23 g y 25 g para MAK-DIG-PYY y 28 g y  
10 26 g para DIG-PYY. Se recolectaron muestras de sangre de aproximadamente 0,1 ml tras los puntos temporales  
siguientes: 0,08 h, 2 h y 24 h para el ratón 1 y 0,08 h, 4 h y 24 h para el ratón 2. Se obtuvieron muestras de suero de  
por lo menos 40 µl tras 1 h a TA mediante centrifugación (9.300 x g, 3 min., 4°C). Las muestras de suero se  
almacenaron a -80°C.

15 La determinación de la cantidad de péptido digoxigenilado en el suero en los puntos temporales dados resultó difícil  
en comparación con la detección de Dig-Cy5 ya que no se disponen de medios directos para detectar el polipéptido  
en las muestras de suero. Por lo tanto, se ha establecido un ensayo de tipo transferencia western para detectar el  
péptido digoxigenilado en el suero. En una primera etapa, se separan las muestras de suero en SDS-PAGE  
reductor. Debido a que la preparación de las muestras incluye la exposición del suero a concentraciones elevadas  
de SDS y agentes reductores, los conjugados de Dig-polipéptido acomplejados pueden resultar liberados del  
20 anticuerpo anti-digoxigenina (completamente desnaturalizado/desplegado), mientras que los conjugados covalentes  
permanecen unidos. Para mediar la liberación del polipéptido del complejo no covalente de anticuerpo y separar los  
componentes individuales mediante SDS-PAGE, se diluyeron 2 µl de cada muestra de suero en 18 µl de histidina 20  
mM/NaCl 140 mM, pH 6,0, se mezcló con 6,7 µl de 4x tampón para muestras LDS y 3 µl de 10x agente reductor de  
muestras (NuPAGE, Invitrogen) durante 5 min. a 95°C. Como control se utilizaron 2 µl de suero de un ratón no  
25 tratado de la misma cepa. Las muestras se aplicaron a un gel Bis-Tris al 4-12% (NuPAGE, Invitrogen) operado a 200  
V/120 mA durante 20 minutos utilizando 1x MES (Invitrogen) como tampón de migración. A continuación, los  
polipéptidos separados se transfirieron a una membrana de PVDF (tamaño de poro: 0,22 µm, Invitrogen) utilizando  
un sistema Mini-Cell XCell Sure Lock® (Invitrogen) durante 40 min. a 25 V/130 mA. Las membranas se bloquearon  
en leche desnatada al 1% en 1x PBS + Tween-20 al 1% (PBST) durante 1 h a TA. Los polipéptidos digoxigenilados  
30 se detectaron seguidamente sobre la membrana con un anticuerpo anti-digoxigenina. Para ello, el anticuerpo  
digoxigenina se aplicó a las membranas a una concentración de 13 µg/ml en 10 ml de leche desnatada al 1%/PBST  
durante 2 h a TA. Las membranas se lavaron 3x 5 min. en 1x PBST. Se aplicaron fragmentos Fab anti-IgG de ratón  
acoplados a POD del kit de transferencia western LumiLight<sup>PLUS</sup> (Roche) a una dilución 1:25 en 10 ml de leche  
desnatada al 1%/PBST durante 1 h a TA. Las membranas se lavaron 3x 5 min. en 1x PBST. La detección se llevó a  
35 cabo mediante incubación de las membranas en 4 ml de sustrato de transferencia western LumiLight durante 5 min.  
a TA. Se detectó la quimiluminiscencia con el Lumilimager F1 (Roche) con un tiempo de exposición de 20 min.

Los resultados de estos análisis se muestran en las figuras 35A y B. Se determinó la presencia/cantidad del  
40 polipéptido digoxigenina en suero murino en diferentes puntos temporales. Los ratones que habían recibido péptidos  
acomplejados con anticuerpo (fig. 35, izquierda) mostraron señales fuertes en el primer punto temporal (5 min.  
después de la administración). Estas señales eran claramente asignables, tal como muestra el tamaño y localización  
sobre el filtro de los controles. En sueros de ratones que habían sido tratados con polipéptido acomplejado con  
anticuerpo, las señales asociadas a polipéptido eran más fuertes en los puntos temporales tempranos y se redujeron  
con el tiempo. Sin embargo, el polipéptido todavía era detectable, con señales fuertes en todos los puntos  
45 temporales e incluso 24 h después de la administración.

En ratones que habían recibido el polipéptido no acomplejado, no se detectaba prácticamente ninguna señal  
asociable al polipéptido pequeño, incluso en el primer punto temporal. La figura 35 muestra a la derecha que bajo  
condiciones de exposición normales, ningún polipéptido libre era visible sobre el filtro. La potenciación del contraste  
50 del filtro reveló la presencia de algo de polipéptido 5 min. después de la administración; sin embargo, sólo en  
cantidades traza. En puntos temporales posteriores, no era detectable ninguna banda de polipéptido definida.

Puede observarse que el polipéptido no acomplejado presenta una semivida muy corta en el suero de los ratones.  
Los ratones que recibieron los mismos polipéptidos aunque en forma acomplejada con anticuerpo mostraban la  
55 presencia de estos polipéptidos en el suero durante un periodo de tiempo incrementado. Veinticuatro horas después  
de la inyección podía determinarse el polipéptido en el suero de estos ratones.

Ejemplo 17

60 Semivida en suero de complejos de digoxigenina-anticuerpo unidos covalentemente e IgG ligantes de digoxigenina

Con el fin de analizar si el acomplejamiento covalente mejoraba adicionalmente las propiedades FQ en vista de los  
complejos de hapteno no unidos covalentemente, se determinaron in vivo los parámetros FQ de los complejos de

anticuerpo anti-digoxigenina-digoxigenina-Cy5, así como los conjugados unidos covalentemente de anticuerpo anti-digoxigenina-Cys]-[Digoxigenina-Cys-Cy5]. Por lo tanto, se determinó la digoxigenina-Cy5 utilizando su fluorescencia (A650) y se determinó el anticuerpo correspondiente mediante un método ELISA que detecta específicamente el anticuerpo humanizado. Se aplicó digoxigenina-Cy5 como 'sustituto' de bajo peso molecular para los péptidos acoplados con hapteno debido a que sus propiedades fluorescentes permiten una detección fácil y precisa en el suero.

De la misma manera indicada para biotina-Cy5 o biotina-Cys-Cy5 (ver el Ejemplo 16), se inyectó por vía intravenosa digoxigenina-Cy5 o digoxigenina-Cy5 acompañado con anticuerpo o unida adicionalmente a anticuerpo-Cys, en ratones NRMI hembra, seguido de la recolección de sangre en 0,08 h, 2 h, 4 h y 24 h. Los valores de fluorescencia mediada por Cy5 detectados para/en ambos ratones 5 min. después de la inyección (t=0,08 h) se fijaron como valor de 100% y los valores de fluorescencia medidos en puntos temporales posteriores se expresaron en relación a dicho valor.

Los resultados de estos experimentos demuestran que para la digoxigenina-Cy5 menos del 10% de la fluorescencia aplicada (valor de 5 min.) era detectable 2 horas después de la inyección. En puntos temporales posteriores, 4 h y 24 h respectivamente después de la inyección, no eran detectables señales mediadas por Cy5 tras la inyección (ver la figura 41). En contraste con el compuesto no acompañado, era detectable compuesto acompañado con anticuerpo a niveles mucho más altos y en puntos temporales posteriores (figura 41). Lo anterior indica que el acompañamiento con anticuerpo incrementa significativamente la semivida en suero del compuesto pequeño digoxigenina-Cy5. Además, las cargas unidas covalentemente muestran una prolongación FQ mayor que los complejos unidos no covalentemente. Una comparación directa de los niveles de digoxigenina-Cy5 y de los niveles de anticuerpo indicó una pérdida de carga del anticuerpo con el tiempo, reduciéndose los niveles de Cy5 más rápidamente que los niveles de anticuerpo. En contraste, los conjugados de digoxigenina unidos covalentemente mostraron semividas en suero de Cy5 e IgG prácticamente idénticas (figura 41). Lo anterior indica que las cargas unidas mediante disulfuro permanecen conectadas establemente a los anticuerpos, mientras que los complejos no covalentes se disocian con el tiempo.

#### Ejemplo 18

##### Semivida en suero y niveles de exposición de complejos de hapteno-anticuerpo unidos covalentemente y complejos que sólo se encuentran unidos mediante el sitio de unión a hapteno

Con el fin de analizar si el acompañamiento covalente mejoraba las propiedades FQ de los complejos de hapteno no unidos covalentemente, se determinó la FQ de un complejo de anticuerpo anti-biotina con biotina-Cy5, así como del conjugado covalentemente [anticuerpo anti-biotina-Cys]-[biotina-Cys-Cy5]. La presencia de Cy5 se determinó no invasivamente mediante la obtención de imágenes ópticas oculares de los animales, que revelaron la fluorescencia de Cy5 en los capilares. Los valores de fluorescencia mediada por Cy5 que detectaron los presentes inventores en los ojos de los ratones 10 min. después de la inyección se fijaron en un valor de 100%, y los valores de fluorescencia medidos en puntos temporales posteriores se expresaron respecto al mismo. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 42: la biotina-Cy5 no acompañada por sí misma presenta una semivida en suero baja y bajos niveles de exposición. El compuesto acompañado con anticuerpo no unido covalentemente era detectable a niveles mucho más altos y con una semivida extendida. Además, las cargas unidas covalentemente mostraban una prolongación FQ mayor y niveles en suero más altos que los complejos unidos no covalentemente. Lo anterior indica que las cargas unidas mediante disulfuro acompañadas con hapteno son más estables en la circulación y pueden alcanzar niveles de exposición más altos que las cargas acompañadas no covalentes.

#### Ejemplo 19

##### Acompañamiento con péptido y conjugación covalente con anticuerpos que se unen a diferentes haptenos

La aplicación de moléculas ligantes de hapteno al acoplamiento de compuestos haptenilados (=cargas) con vehículos de reconocimiento es una posibilidad técnica que podría permitir la administración mediada por hapteno. El concepto puede expandirse a haptenos adicionales o a otras entidades que capturan compuestos y los conectan al módulo de reconocimiento. Por ejemplo, para la administración o estabilización del péptido, pueden utilizarse anticuerpos mono- o bi-específicos ligantes de digoxigenina u otros haptenos, para estabilizar y optimizar la FQ de los polipéptidos terapéuticos.

Los requisitos previos para la utilización como módulos de captura de polipéptido son: (i) que el acoplamiento de los compuestos al hapteno no interfiera gravemente con la actividad del polipéptido, e (ii) la posibilidad de unión/acoplamiento eficaz del anticuerpo con los compuestos haptenilados.

La unión dirigida por hapteno es un requisito previo para el acoplamiento covalente eficiente de los pigmentos o

polipéptidos haptencilados con un anticuerpo cisteinilado anti-hapteno.

Con el fin de demostrar que el acomplejamiento controlado por afinidad de los compuestos haptencilados con anticuerpos anti-hapteno es un requisito previo para la formación eficiente de enlaces disulfuro, se incubó biotina-Cys-Cy5 con anticuerpo anti-digoxigenina humanizada y anticuerpo anti-digoxigenina humanizado VH53C. La incubación de biotina-Cys-Cy5 con anticuerpo anti-biotina humanizado y anticuerpo anti-biotina humanizado VH53C se llevó a cabo como una reacción de control.

Se disolvieron 0,13 mg de biotina-Cys-Cy5 en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizaron 0,7 mg de cada anticuerpo a una concentración de 6,7 mg/ml (aproximadamente 46  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló biotina-Cys-Cy5 y anticuerpos en una proporción molar de 2,5:1 (Ac-biotina-Cys-Cy5 a anticuerpo) y se incubó durante 60 min. a TA y se agitaron a 350 rpm. El complejo/conjugado resultante se analizó adicionalmente mediante SDS-PAGE y posteriormente se realizó la detección de la fluorescencia relacionada con Cy5 en el gel de poliacrilamida. Se mezclaron 15  $\mu$ g del complejo/conjugado con 4x tampón para muestras LDS (Invitrogen) y se incubaron a 95°C durante 5 min. Se registró la fluorescencia relacionada con Cy5 utilizando un dispositivo Lumilmager F1 (Roche) a una longitud de onda de excitación de 645 nm.

Las muestras no reducidas mostraban la formación covalente específica de sitio de enlaces disulfuro para el anticuerpo anti-biotina humanizado VH53C (fig. 36, carril 4) con una señal de fluorescencia de fondo muy baja al utilizar anticuerpo anti-biotina humanizado sin una cisteína en la RDC2 (fig. 36, carril 3). También se acopló covalentemente biotina-Cys-Cy5 con anticuerpo anti-digoxigenina humanizado VH52bC (fig. 36, carril 2) con una señal de fondo baja al utilizar anticuerpo anti-digoxigenina humanizado (fig. 36, carril 1) pero con una eficiencia significativamente más baja. Lo anterior puede deducirse del exceso de biotina-Cys-Cy5 que se detectaba en el fondo del gel (flechas). En el caso del anticuerpo anti-digoxigenina humanizado VH52bC podía detectarse significativamente más biotina-Cys-Cy5 no acoplada (carril 2) que con el anticuerpo anti-biotina humanizado VH53C (carril 4). Tras la reducción de las muestras, no era detectable fluorescencia relacionada con Cy5 en proximidad a las cadenas pesada y ligera de anticuerpo, indicando que efectivamente se formaba el enlace covalente mediante un puente disulfuro. Las tinciones de Coomassie de cada gel muestran que la cantidad total de proteína en cada carril era igual.

#### Ejemplo 20

La unión dirigida por hapteno es un requisito previo para el acoplamiento covalente eficiente de los pigmentos o polipéptidos haptencilados con un anticuerpo cisteinilado anti-hapteno

Con el fin de mostrar que el acomplejamiento controlado por afinidad de los compuestos haptencilados con anticuerpos anti-hapteno es un requisito previo para la formación eficiente de enlaces disulfuro, se incubó el péptido no haptencilado Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>) (Bosynthan 1763.1, SEC ID n° 178) con anticuerpo humanizado anti-digoxigenina VH52bC y anticuerpo anti-digoxigenina humanizado. Se disolvieron 1,4 mg de Ac-PYY(PEG3-cys-4Abu-NH<sub>2</sub>) en DMF al 100% hasta una concentración de 10 mg/ml. Se utilizaron 2 mg de cada anticuerpo a una concentración de 11-13 mg/ml (aproximadamente 75-89  $\mu$ M) en un tampón compuesto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2. Se mezcló Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>) y anticuerpos en una proporción molar de 2,1:1 (Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>) a anticuerpo). Se añadió el péptido en 3 porciones, mientras que la solución se agitó a 500 rpm con una barra de agitación. Entre cada adición, las muestras se incubaron durante 5 min. a 200 rpm. Tras la adición de la última porción, las muestras se incubaron durante 1 h a TA y se agitaron a 200 rpm.

El complejo/conjugado resultante se definió como 97% molécula de tipo IgG monomérica y 3% agregados solubles diméricos para Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>): conjugado de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina VH52bC y como 100% monomérico para Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>): complejo de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Además, el complejo/conjugado resultante se analizó mediante espectrometría de masas. Para conjugado Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>): anticuerpo humanizado anti-digoxigenina VH52bC se identificó que 17% de la especie detectada era anticuerpo acoplado con 2 moléculas de péptido; 51% era anticuerpo acoplado con 1 molécula de péptido y 32% era anticuerpo sin péptido acoplado. Para el complejo de Ac-PYY(PEG3-Cys-4Abu-NH<sub>2</sub>): anticuerpo anti-digoxigenina humanizada, el 100% del anticuerpo se encontraba no acoplado.

#### Ejemplo 21

Patrones de disulfuros que resultan necesarios para la formación de anticuerpos ligantes de hapteno funcionales correctamente plegados con una mutación de cisteína para el acoplamiento de carga covalente

Los módulos ligantes de hapteno para el acoplamiento covalente de compuesto/carga pueden estar compuestos de



anticuerpos 'estándares', tales como IgG que contienen cisteínas adicionales que permiten la unión covalente de compuestos/cargas haptenilados. El método tal como se informa en la presente memoria introduce las funcionalidades (cisteínas) requeridas dentro de dominios plegados, la estructura y secuencia de los cuales proporciona la base para la funcionalidad del anticuerpo. La formación correcta de los enlaces disulfuro definidos dentro así como entre los dominios de los anticuerpos resulta esencial para la formación y mantenimiento de la estructura y funcionalidad correctas. La figura 37(A) muestra el patrón de disulfuros que resulta necesario para formar brazos de unión funcionales, tales como Fab de anticuerpos no modificados, y la figura 37(B) muestra el patrón de disulfuros que resulta necesario para mantener la estructura y funcionalidad del derivado de anticuerpo mutado VH52cB/VH53C. Con el fin de mantener el patrón de disulfuros correcto, la cisteína adicional que se introdujo en el dominio VH debe encontrarse no ocupada y no debe interferir o reaccionar con las cisteínas vecinas. Las figuras 37(C) y 37(D) muestran que las adiciones de las cisteínas adicionales generan posibilidades de formación de disulfuros incorrectos dentro de los dominios VH durante la biosíntesis de dichas moléculas. El hecho de que la posición de VH52bC/VH53C se encuentre dentro del dominio VH (y bastante próximo a otras cisteínas) agrava el riesgo de formación de disulfuros incorrectos durante la biosíntesis de la cadena pesada. Otro problema potencial es que los dominios VH y VL se ensamblan en la ruta secretoria en un fragmento Fv. La ruta secretoria implica condiciones de reorganización redox y formación de disulfuros y enzimas reorganizativas. Por lo tanto, el potencial de introducción de disulfuros incorrectos mediante la adición de la mutación VH52bC/VH53C puede 'extenderse' también a disulfuros de la cadena ligera (mostrada ejemplarmente en la figura 37(E)). Lo anterior potencia adicionalmente el riesgo de obtener/generar moléculas no funcionales incorrectamente plegadas. Por lo tanto, resulta bastante inesperado que, a pesar de estos riesgos, puedan expresarse y obtenerse cantidades considerables de derivados de anticuerpo funcionales homogéneos que contienen la mutación VH52bC/VH53C, y que son capaces de conectarse covalentemente con compuestos/cargas haptenilados.

#### Ejemplo 22

#### Composición y generación de fragmentos Fv de cadena sencilla estabilizados con disulfuro anti-hapteno con una mutación de cisteína para el acoplamiento covalente

Los módulos ligantes de hapteno para el acoplamiento covalente de compuesto/carga pueden consistir de anticuerpos 'estándares' tales como IgG. Alternativamente, pueden ser entidades modificadas, tales como fragmentos Fv o Fab recombinantes, o derivados de los mismos. Los fragmentos Fv de cadena sencilla se utilizan frecuentemente como alternativas a los anticuerpos de longitud completa, especialmente en aplicaciones en las que se requiere un tamaño de módulo pequeño, o en donde se desean módulos de unión adicionales para generar derivado de anticuerpo bi- o multi-específicos. Un ejemplo de entidades derivadas de Fv anti-hapteno que han sido generadas es un Fv de cadena sencilla estabilizado por disulfuro que se une y conecta covalentemente los compuestos/cargas digoxigenilados. El Fv de cadena sencilla estabilizado por disulfuro con especificidad de unión a Dig se generó mediante la conexión de los dominios VH y VL de anticuerpo anti-digoxigenina mediante un conector flexible rico en Gly y Ser entre sí. Estos dominios VH y VL alojaban además mutaciones de cisteína en la posición 44 de VH y en la posición 100 de VL (posiciones según Kabat et al.). Estas cisteínas adicionales forman un enlace disulfuro intermolecular estable entre VH y VL. Lo anterior estabiliza el scFv, tal como se ha indicado anteriormente (por ejemplo Reiter Y. et al., Nature Biotechnology 14:1239-1245, 1996).

Además de lo anterior, se introdujo otra cisteína en la VH en la posición 52b o 53, respectivamente, según la numeración de Kabat, para añadir la funcionalidad de enlace covalente al fragmento Fv.

Sin embargo, la introducción de dicha mutación en fragmentos Fb estabilizados por disulfuro es mucho más complicada que introducirla en anticuerpos de longitud completa. Los fragmentos Fv de cadena sencilla son inherentemente menos estables que las IgG de longitud completa o los fragmentos Fab debido a que no presentan dominios constrnates como entidades estabilizadores y que fuerzan la heterodimerización. Puede conferirse la estabilidad mediante la introducción de mutaciones de cisteína adicionales en los Fv, tal como el disulfuro VH44-VL100. Sin embargo, dicho principio de estabilización funciona únicamente en el caso de que el disulfuro se forme en las posiciones correctas entre las cisteínas correctas. De esta manera, además de los disulfuros intradominio definidos (uno en VH y uno en VL), necesita formarse un único disulfuro entre dominios correcto definido. Las conexiones disulfuro entre cisteínas no correspondientes generará entidades incorrectamente plegadas inestables y no funcionales. Considerando que un fragmento Fv estabilizado por disulfuro contiene 6 cisteínas, en teoría pueden formarse 21 conexiones disulfuro diferentes, aunque únicamente la combinación correcta de 3 disulfuros definidos formará un scdsFv estabilizado funcional. Este reto resulta agravado por la adición de otra cisteína libre al dominio VH. El dsFv estabilizado que se desea contiene dos disulfuros intradominio definidos (uno en VH y uno en VL), un disulfuro interdominio definido (entre VH y VL) y además una cisteína libre para el acoplamiento de compuesto/carga haptenilado (en VH en la posición 52b/53). Considerando que un fragmento Fv estabilizado por disulfuro con una mutación de cisteína adicional para el acoplamiento covalente contiene 7 cisteínas, en teoría pueden formarse muchas conexiones de disulfuro diferentes, aunque únicamente la combinación correcta de los 3 disulfuros definidos, con la posición de cisteína libre exacta en VH52b/VH53 resultará en un dsFv de acoplamiento covalente

competente estabilizado funcional. Un reto adicional es el hecho de que la cisteína libre adicional (VH52b/VH53) se encuentra situada en estrecha proximidad a la cisteína VH44, que no es una cisteína natural sino una mutación introducida para la estabilización por disulfuro. Resulta necesaria VH44C para la formación del disulfuro interdominio correcto, y este disulfuro con todavía probabilidad, aunque sin restringirse a esta teoría, se forma después del plegamiento y ensamblaje independientes de VH y VL. La proximidad de VH44C y VH52bC/VH53C agrava el riesgo de que el disulfuro intradominio no se forme de manera correcta. Aunque se ha encontrado que pueden producirse módulos de Fv de cadena sencilla estabilizados por disulfuro funcionales que se unen a digoxigenina y que son capaces simultáneamente de conectarse covalentemente a cargas digoxigeniladas. La composición de la molécula de Fv de cadena sencilla estabilizada por disulfuro que contiene los disulfuros correctos y la cisteína libre en la posición incorrecta y su comparación con las moléculas incorrectamente plegadas no deseadas se muestra en la figura 38. Las secuencias que codifican las regiones variables de cadena ligera y las regiones variables de cadena pesada modificadas de dichos scdsFv ligantes de Dig con el derivado de anticuerpo Fv con la mutación VH52bC se listan en SEC ID n° 190 (VH) y la VL correspondiente en SEC ID n° 189. La generación con éxito de dichos dsFv como módulos para la generación de derivados de anticuerpo biespecífico se indica en el Ejemplo 23 (a continuación), así como en las figuras 40(A), fig. 40(B) y fig. 40(C).

#### Ejemplo 23

##### Composición, expresión y purificación de derivados de anticuerpo anti-hapteno biespecífico para la administración dirigida de compuestos/cargas acopladas covalentemente

Se generaron anticuerpos biespecíficos que contenían módulos de anticuerpo ligantes de hapteno para el acoplamiento covalente de compuesto/carga. Estos anticuerpos contenían adicionalmente módulos ligantes que permitían la administración dirigida a otros antígenos. Entre las aplicaciones de dichos anticuerpos biespecíficos se incluyen la administración dirigida específica de compuestos /cargas haptenilados a células o tejidos que portan el antígeno diana. Un ejemplo de dichas moléculas que se generó es un anticuerpo biespecífico con regiones ligantes que reconocen el antígeno carbohidrato asociado a tumor LeY y simultáneamente con Fv estabilizados por disulfuro que se unen y conectan covalentemente los compuestos/cargas digoxigenilados. Por lo tanto, los Fv de cadena sencilla estabilizados por disulfuro se conectaron mediante péptidos conectores flexibles ricos en Gly y Ser a los extremos C-terminales de los dominios CH3 de un anticuerpo de LeY, resultando en moléculas tetravalentes con dos brazos de unión a LeY y adicionalmente dos entidades de unión a digoxigenina. Las entidades de unión a digoxigenina incluían un enlace disulfuro VH44-VL100 que ha sido descrito anteriormente (por ejemplo Reiter Y. et al., Nature Biotechnology 14:1239-1245, 1996). La entidad de unión a digoxigenina contiene además la mutación VH52bC para el acoplamiento covalente. Las secuencias que codifican la cadena ligera y la cadena pesada modificada de dicho derivado de anticuerpo de LeY-Dig se listan en SEC ID n° 191 y SEC ID n° 192. La composición del derivado de anticuerpo biespecífico de LeY-Dig como vehículo de administración para compuestos/cargas acoplados covalentemente se muestra esquemáticamente en la figura 39.

Las moléculas biespecíficas se generaron mediante técnicas de biología molecular, se expresaron mediante secreción a partir de células en cultivo y se purificaron posteriormente a partir de sobrenadantes de cultivo de la misma manera indicada anteriormente. La figura 40(A) muestra la presencia de cadena P y cadena L modificadas de dicho anticuerpo biespecífico de LeY-Dig (52bC) en sobrenadantes de cultivo celular, visualizados en análisis de transferencia western que detectan cadenas L y cadenas P de anticuerpo. La figura 40(B) demuestra la homogeneidad de dichos anticuerpos tras la purificación mediante SDS-PAGE en presencia de un agente reductor. La tinción del SDS-PAGE con azul brillante de Coomassie visualiza las cadenas polipeptídicas relacionadas con la IgG con tamaños moleculares aparentes análogos a sus pesos moleculares calculados. La figura 40(C) muestra el perfil de CET del anticuerpo biespecífico de LeY-Dig(52bC) tras la purificación con proteína A, demostrando la homogeneidad y la falta de agregados en las preparaciones de proteínas. De esta manera, los anticuerpos biespecíficos que contienen módulos de reconocimiento, así como módulos para el acoplamiento covalente de compuestos/cargas haptenilados pueden generarse y purificarse hasta la homogeneidad.

#### Ejemplo 24

##### Determinación de la estructura de rayos X de fragmentos Fab de anticuerpo murino anti-biotina en complejo con biocitidinamida

Se determinó la estructura proteica del fragmento Fab de anticuerpo murino anti-biotina en complejo con biocitidinamida. Por lo tanto, se hicieron crecer cristales del fragmento Fab en ácido succínico 0,8 M, seguido de la carga de los cristales de anticuerpo con biocitidinamida (diluida a una concentración de trabajo de 10 mM en solución de cristalización, aplicada a los cristales en la gota de cristalización). Se lavaron los cristales tres veces con 2 µl de solución de biocitidinamida 10 mM y se incubaron finalmente durante 16 h con biocitidinamida a 21°C; se recolectaron con glicerol al 15% como crioprotector y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Las imágenes de difracción procesadas rindieron una estructura de proteína a una resolución de 2,5 Å. La estructura y

composición de cargas de la región variable de unión a biotina se muestran en la figura 46. La biotina se une a un bolsillo superficial que se encuentra flanqueado por regiones cargadas que están compuestas de aminoácidos de las regiones RDC. El hapteno acomplejado se encuentra situado en estrecha proximidad a un grupo de aminoácidos cargado negativamente. La biotina, que, como hapteno, se encuentra derivatizada para el acoplamiento de carga en su grupo carboxilo, se une con buena eficacia, ya que no existe repulsión de cargas en esta posición (debido a la falta de grupo COOH). En contraste, la biotina libre (normal) no puede unirse eficientemente al anticuerpo debido a que su grupo carboxilo se encontraría en estrecha proximidad a dicho grupo de carga negativa y por lo tanto resultaría repelido.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Conjugados de antígeno-anticuerpo unidos covalentemente

<130> 31087 WO

<150> EP12174947.7

<151> 2012-07-04

<160> 192

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 604 012 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Asn Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

5  
 <210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10  
 <400> 5

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser  
 1 5 10

15  
 <210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20  
 <400> 6

Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
 1 5

25  
 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

30  
 <400> 7

Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr  
 1 5

<210> 8

ES 2 604 012 T3

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 8

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

10 <210> 9  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina  
 <400> 9

20 Asp Tyr Ala Met Ser  
 1 5

<210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

30 <400> 10

Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 11

ES 2 604 012 T3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina  
 <400> 11

10 Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr  
 1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

20 <400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

25 <210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

ES 2 604 012 T3

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

5 <210> 14  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 14

Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser  
1 5

15 <210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

25 <400> 15

Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr  
1 5

30 <210> 16  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> VL de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

ES 2 604 012 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 17  
<211> 5  
5 <212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 17

10 Asp Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 18  
<211> 17  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VH52bC RHV-H2 de anticuerpo murino anti-digoxigenina  
20 <400> 18

Ser Ile Asn Ile Cys Ala Thr Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 19  
25 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 19

30 Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr  
1 5 10 15

<210> 20  
35 <211> 125  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> VH52bC VH de anticuerpo murino anti-digoxigenina  
  
<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly



ES 2 604 012 T3

```

1             5             10             15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
          20             25             30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Asn Arg Leu Glu Trp Val
          35             40             45

Ala Ser Ile Asn Ile Cys Ala Thr Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
          50             55             60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65             70             75             80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85             90             95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met
          100            105            110

Ala Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
          115            120            125

```

<210> 21  
 <211> 11  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 21

```

10             Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser
          1             5             10

```

<210> 22  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 22

```

20             Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp
          1             5

```

<210> 23  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 23

```

30             Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr
          1             5

```

<210> 24  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

ES 2 604 012 T3

<400> 24

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Arg  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

- 5 <210> 25
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> VH52bC RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 25

- 15 Asp Tyr Ala Met Ser  
1 5

- <210> 26
- <211> 17
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> VH52bC RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

25 <400> 26

Ser Ile Asn Ile Cys Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

- 30 <210> 27
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 35 <223> VH52bC RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

ES 2 604 012 T3

<400> 27

5 Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> VH52bC VH de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 28

15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Cys Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 29

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH52bC RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

25

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

30

<210> 30

<211> 7

ES 2 604 012 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> VH52bC RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 30

Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser  
1 5

10 <210> 31  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> VH52bC RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 31

20 Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr  
1 5

<210> 32  
<211> 107  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> VH52bC VL de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

35 <210> 33  
<211> 5

ES 2 604 012 T3

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 33

5

Asp Thr Phe Phe Gln  
1 5

<210> 34  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10

<400> 34

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15

15

Gly

<210> 35  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

20

<400> 35

Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

25

<210> 36  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

30

<400> 36

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

ES 2 604 012 T3

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr  
 20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Glu Cys Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

5 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 37

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser  
 1 5 10

15 <210> 38  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 38

20 Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
 1 5

25 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 39

30 Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr  
 1 5

35 <210> 40  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 40

ES 2 604 012 T3

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

5 <210> 41  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-biotina  
 <400> 41

15 Asp Thr Phe Phe Gln  
 1 5

<210> 42  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-biotina  
 <400> 42

25 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

30 <210> 43  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-biotina

ES 2 604 012 T3

<400> 43

Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

5 <210> 44  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> VH de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr  
20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 45  
<211> 11  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-biotina

25 <400> 45

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser  
1 5 10

30 <210> 46  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial



ES 2 604 012 T3

<220>

<223> RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-biotina

5 <400> 46

Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
1 5

<210> 47

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 47

Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr  
1 5

20

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> VL de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 48

30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

35 <210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

40 <400> 49

ES 2 604 012 T3

Asp Thr Phe Phe Gln  
1 5

5 <210> 50  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> VH53C RHV-H2 de anticuerpo murino anti-biotina

<400> 50

Arg Ile Asp Pro Cys Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15

15 Gly  
<210> 51  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
20 <400> 51

Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

25 <210> 52  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> VH53C VH de anticuerpo murino anti-biotina

<400> 52

35 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala



ES 2 604 012 T3

<400> 56

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
           20           25           30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
           35           40           45

Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr
           85           90           95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105

```

5 <210> 57  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> VH53C RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-biotina  
 <400> 57

```

Asp Thr Phe Phe Gln
1           5

```

15 <210> 58  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> VH53C RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-biotina

25 <400> 58

```

Arg Ile Asp Pro Cys Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1           5           10           15

Gly

```

30 <210> 59  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 604 012 T3

<220>

<223> VH53C RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-biotina

5 <400> 59

Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

<210> 60

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> VH53C VH de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 60

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Asn Asn Lys Asp Thr  
 20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Cys Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> VH53C RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 61

30

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser  
 1 5 10

ES 2 604 012 T3

<210> 62  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH53C RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-biotina

10 <400> 62

Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
 1 5

15 <210> 63  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> VH53C RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 63

Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr  
 1 5

25 <210> 64  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> VH53C VL de anticuerpo humanizado anti-biotina

35 <400> 64

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 65

ES 2 604 012 T3

<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

5 <400> 65

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5

10 <210> 66  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

15 <400> 66

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

20 <210> 67  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 67

25 Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

30 <210> 68  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 68

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

ES 2 604 012 T3

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp  
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Phe Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Gln Phe Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 69  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 69  
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

15 <210> 70  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 70  
 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

25 <210> 71  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 71  
 Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr  
 1 5

30 <210> 72  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

35 <400> 72



ES 2 604 012 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn  
20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Val Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Met Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly  
85 90 95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 73

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

10

<400> 73

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5

15 <210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 74

25 Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

35 <400> 75

Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

ES 2 604 012 T3

<210> 76  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> VH de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
  
 10 <400> 76  
  
           Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
           1                  5                  10                  15  
  
           Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
                   20                  25                  30  
  
           Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                   35                  40                  45  
  
           Ile Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu  
                   50                  55                  60  
  
           Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
           65                  70                  75                  80  
  
           Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
  
           Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                   100                  105                  110  
  
           Thr Val Ser Ser  
                   115  
  
 15 <210> 77  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
  
 <400> 77  
  
                   Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu  
                   1                  5                  10                  15  
 25  
 <210> 78  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
  
 <400> 78  
 35

ES 2 604 012 T3

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

5 <210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
<400> 79

Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr  
1 5

15 <210> 80  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> VL de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
<400> 80

25 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn  
20 25 30  
Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly  
85 90 95  
Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

30 <210> 81  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 81

35 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5

<210> 82

ES 2 604 012 T3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> VH53C RHV-H2 de anticuerpo murino anti-teofilina

<400> 82

10 Tyr Ile Arg Cys Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 83  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

15

<400> 83

20 Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 84  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> VH53C VH de anticuerpo murino anti-teofilina

<400> 84

30 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp  
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Cys Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Phe Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Gln Phe Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

35 <210> 85  
 <211> 16

ES 2 604 012 T3

<212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 85

5 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

<210> 86  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 86

15 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

<210> 87  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 87

20 Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 88  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 88

30 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn  
 20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Val Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Met Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly  
 85 90 95

35 Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 89  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

ES 2 604 012 T3

<220>  
<223> VH53C RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

5 <400> 89

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5

<210> 90  
<211> 16  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VH53C RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

15 <400> 90

Tyr Ile Arg Cys Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

20 <210> 91  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> VH53C RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 91

30 Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 92  
35 <211> 116  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> VH53C VH de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 92

ES 2 604 012 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Arg Cys Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 93  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> VH53C RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
 <400> 93

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

15 <210> 94  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> VH53C RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
 <400> 94

25 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

30 <210> 95  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH53C RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

ES 2 604 012 T3

<400> 95

Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr  
1 5

5

<210> 96  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> VH53C VL de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 96

15

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn  
20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly  
85 90 95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 97  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

20

<400> 97

His Tyr Trp Met Asn  
1 5

25

<210> 98  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

30

<400> 98

Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser  
1 5 10 15

Val Lys Gly



ES 2 604 012 T3

<210> 99  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus

<400> 99

Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr  
 1 5

10 <210> 100  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus

<400> 100

Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr  
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

20 <210> 101  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus

<400> 101

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg  
 1 5 10 15

30 <210> 102  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

35 <400> 102

ES 2 604 012 T3

Lys Val Ser Asn Arg Val Ser  
1 5

5 <210> 103  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 103

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 104  
<211> 120  
<212> PRT  
15 <213> Mus musculus

<400> 104

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

20 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
115 120

<210> 105  
<211> 5  
<212> PRT  
25 <213> Mus musculus

<400> 105

His Tyr Trp Met Asn  
1 5

30 <210> 106  
<211> 19  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 604 012 T3

<223> VH53C RHV-H2 de anticuerpo murino anti-fluoresceína

<400> 106

Gln Phe Arg Asn Cys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser  
1 5 10 15

5 Val Lys Gly

<210> 107

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 107

Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr  
1 5

15

<210> 108

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> anticuerpo murino anti-fluoresceínaVH53C VH

<400> 108

25

Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe Gly His Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Gln Phe Arg Asn Cys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 109

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

ES 2 604 012 T3

<400> 109

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg  
 1 5 10 15

5 <210> 110  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 10 <400> 110

Lys Val Ser Asn Arg Val Ser  
 1 5

15 <210> 111  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20 <400> 111

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr  
 1 5

25 <210> 112  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 30 <400> 112

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

35 <210> 113  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

ES 2 604 012 T3

<400> 113

His Tyr Trp Met Asn  
1 5

5

<210> 114  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10

<400> 114

Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser  
1 5 10 15

Val Lys Gly

15

<210> 115  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

20

<400> 115

Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr  
1 5

25

<210> 116  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> VH28C VH de anticuerpo murino anti-fluoresceína

<400> 116

ES 2 604 012 T3

Gly Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ala Met Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Cys Phe Gly His Tyr  
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Gln Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp  
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser  
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Ile Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ala Ser Tyr Gly Met Glu Tyr Leu Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 117  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 117

10 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg  
 1 5 10 15

<210> 118  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 118

20 Lys Val Ser Asn Arg Val Ser  
 1 5

<210> 119  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 119

25 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr  
 1 5

30 <210> 120  
 <211> 112  
 <212> PRT

ES 2 604 012 T3

<213> Mus musculus

<400> 120

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

5 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

10 <210> 121  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 121

15 Asp Tyr Ala Met Ser  
1 5

20 <210> 122  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 122

Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

25 Gly

30 <210> 123  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 123

ES 2 604 012 T3

Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 124  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> VH28C VH de anticuerpo murino anti-digoxigenina  
 <400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Cys Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Asn Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

15 <210> 125  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20 <400> 125

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn  
 1 5 10

25 <210> 126  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

30 <400> 126

Tyr Ser Ser Thr Leu Ser  
 1 5

<210> 127



ES 2 604 012 T3

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 127

Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr  
 1 5

10 <210> 128  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

15 <400> 128

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

20 <210> 129  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> VH28C RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 129

Asp Tyr Ala Met Ser  
 1 5

30 <210> 130  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> VH28C RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 130

40

ES 2 604 012 T3

Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 131  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH28C RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina  
 10 <400> 131

Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr  
 1 5 10 15

15 <210> 132  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VH28C VH de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina  
 <400> 132

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Cys Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
 100 105 110

25 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 133  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 604 012 T3

<220>

<223> VH28C RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

5 <400> 133

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

10 <210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> VH28C RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 134

Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser  
1 5

20

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> VH28C RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

<400> 135

30

Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr  
1 5

<210> 136

<211> 108

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH28C VL de anticuerpo humanizado anti-digoxigenina

40

<400> 136

ES 2 604 012 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

5 <210> 137  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 137

Asp Thr Phe Phe Gln  
 1 5

15 <210> 138  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 138

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

20 Gly

<210> 139  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus

<400> 139

Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

30 <210> 140  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

ES 2 604 012 T3

<220>

<223> VH28C VH de anticuerpo murino anti-biotina

<400> 140

5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ser Ser Gly Phe Cys Asn Lys Asp Thr  
20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Glu Cys Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 141

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 141

15

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser  
1 5 10

<210> 142

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 142

25

Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
1 5

<210> 143

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 143

ES 2 604 012 T3

Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr  
 1 5

5 <210> 144  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 144

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

15 <210> 145  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> VH28C RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-biotina  
 <400> 145

25 Asp Thr Phe Phe Gln  
 1 5

<210> 146  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> VH28C RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 146  
 35

ES 2 604 012 T3

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 147  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> VH28C RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-biotina  
 <400> 147

Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

15 <210> 148  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VH28C VH de anticuerpo humanizado anti-biotina  
 <400> 148

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Cys Asn Lys Asp Thr  
 20 25 30

Phe Phe Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Phe Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Thr Tyr Gly Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

25 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 149  
 <211> 11  
 <212> PRT

ES 2 604 012 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH28C RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-biotina

5

<400> 149

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ser  
1 5 10

10 <210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> VH28C RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 150

Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
1 5

20

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH28C RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-biotina

30 <400> 151

Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr Thr  
1 5

35

<210> 152

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> VH28C VL de anticuerpo humanizado anti-biotina

<400> 152



ES 2 604 012 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ser Ile Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

5 <210> 153  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10 <400> 153

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5

15 <210> 154  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 154

20 Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

25 <210> 155  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 155

30 Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

35 <210> 156  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> VH28C VH de anticuerpo murino anti-teofilina

ES 2 604 012 T3

<400> 156

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Thr Gly Tyr Cys Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp  
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Phe Lys Asn Gln Phe Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Phe Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

5

<210> 157  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

10

<400> 157

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

15

<210> 158  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

20

<400> 158

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

25

<210> 159  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 159

30

Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 160

ES 2 604 012 T3

<211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5 <400> 160

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1          5          10          15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn
          20          25          30
Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Val Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50          55          60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Met Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly
          85          90          95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
  
```

10 <210> 161  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> VH28C RHV-H1 de anticuerpo humanizado anti-teofilina  
 <400> 161

```

          Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
20          1          5
  
```

<210> 162  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VH28C RHV-H2 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

30 <400> 162

```

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1          5          10          15
  
```

<210> 163  
 35 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 604 012 T3

<223> VH28C RHV-H3 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 163

5 Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 164

<211> 116

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH28C VH de anticuerpo humanizado anti-teofilina

15 <400> 164

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Cys Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

20 <210> 165

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> VH28C RHV-L1 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 165

30 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 166

<211> 7

ES 2 604 012 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> VH28C RHV-L2 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 166

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

10 <210> 167  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> VH28C RHV-L3 de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 167

20 Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 168  
 <211> 112  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> VH28C VL de anticuerpo humanizado anti-teofilina

<400> 168

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn  
 20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

35 <210> 169  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 604 012 T3

<400> 169

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

ES 2 604 012 T3

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

5 <210> 170  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 170

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

10

ES 2 604 012 T3

130						135						140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145					150					155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
225					230					235					240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275					280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
305					310					315					320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				325					330							

<210> 171  
 <211> 330  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 171

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

10 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr



ES 2 604 012 T3

			20					25				30				
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35					40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50					55					60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
65					70					75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			85						90					95		
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			100					105					110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
		115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
	130					135					140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145					150					155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
225					230					235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270			

ES 2 604 012 T3

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 172  
 <211> 330  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 172

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

10

ES 2 604 012 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 173  
 <211> 327  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 173

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

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

10

ES 2 604 012 T3

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300  
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

ES 2 604 012 T3

<211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 174

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

ES 2 604 012 T3

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 175  
 <211> 327  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 175

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

10

ES 2 604 012 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Gly Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 176

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 604 012 T3

<220>  
 <223> polipéptido haptencilado 01 - Ac IK Pqa R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(t  
 Bu)  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X=Me-ARG  
 15  
 <400> 176  
  

Ile	Lys	Xaa	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Gln	Xaa	Tyr
1				5					10					15

  
 20 <210> 177  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 02  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (2)..(2)  
 <223> -PEG3-dig  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 35 <222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 40 <222> (14)..(14)  
 <223> X=Me-ARG  
  
 <400> 177  
  

Ile	Lys	Xaa	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Gln	Xaa	Tyr
1				5					10					15

  
 45 <210> 178  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 03  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55 <222> (2)..(2)  
 <223> -PEG3-Cys-4Abu-NH2  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 60



ES 2 604 012 T3

<222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA

<220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X=Me-ARG

<400> 178  
 10  
                   Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Xaa Tyr  
                   1                  5                  10                  15

<210> 179  
 <211> 15  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> polipéptido haptencilado 04  
 20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> -PEG3-Cys-4Abu-dig  
 25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA  
 30

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(24)  
 <223> X=Me-ARG  
 35

<400> 179  
                   Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Xaa Tyr  
                   1                  5                  10                  15

<210> 180  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40

<220>  
 <223> polipéptido haptencilado 05  
 45

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> -PEG3-Cys-4Abu-NH2  
 50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA  
 55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X=Me-ARG  
 60

ES 2 604 012 T3

<400> 180

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Xaa Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 181  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 06 - PEG2-IK(ivDde)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(tBu)R(Pbf)Q( Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X=PEG2

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> -ivDde

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X=PQA

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> X=Me-ARG

35 <400> 181

Xaa Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Xaa Tyr  
 1 5 10 15

40 <210> 182  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 07

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X=PEG2

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> -PEG3-Cys-Abu-NH2

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X=PQA

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 5 <223> X=Me-ARG  
  
 <400> 182  
  

	Xaa	Ile	Lys	Xaa	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Gln	Xaa	Tyr
	1				5					10					15	

  
 10 <210> 183  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 08  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X=PEG2  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> -PEG3-Cys-4Abu-dig  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X=PQA  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> X=Me-ARG  
  
 <400> 183  
  

	Xaa	Ile	Lys	Xaa	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Gln	Xaa	Tyr
	1				5					10					15	

  
 40 <210> 184  
 <211> 15  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 09  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> -PEG2-biotin  
  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA  
  
 60

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X=Me-ARG  
 5 <400> 184  
  
                   Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Xaa Tyr  
                   1                  5                  10                  15  
 10 <210> 185  
     <211> 15  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
     <223> polipéptido haptencilado 10  
  
     <220>  
     <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (2)..(2)  
     <223> -PEG3-Cys-β-Ala-biotin  
  
     <220>  
     <221> MISC\_FEATURE  
 25 <222> (3)..(3)  
     <223> X=PQA  
  
     <220>  
     <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (14)..(14)  
     <223> X=Me-ARG  
  
     <400> 185  
  
                   Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Xaa Tyr  
                   1                  5                  10                  15  
 35 <210> 186  
     <211> 15  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
     <223> polipéptido haptencilado 11  
 45 <220>  
     <221> MISC\_FEATURE  
     <222> (2)..(2)  
     <223> -PEG3-Cys-PEG2-biotina  
 50 <220>  
     <221> MISC\_FEATURE  
     <222> (3)..(3)  
     <223> X=PQA  
 55 <220>  
     <221> MISC\_FEATURE  
     <222> (14)..(14)  
     <223> X=Me-ARG  
 60 <400> 186

ES 2 604 012 T3

	Ile	Lys	Xaa	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Gln	Xaa	Tyr
	1				5					10					15

5 <210> 187  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 12

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> -PEG3-Cys-4-Abu-5-Fluo

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X=Me-ARG

<400> 187

	Ile	Lys	Xaa	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Gln	Xaa	Tyr
	1				5					10					15

30 <210> 188  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> polipéptido haptencilado 13

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> -PEG3-Cys-PEG2-5-Fluo

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X=PQA

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X=Me-ARG

<400> 188

55

	Ile	Lys	Xaa	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Trp	Val	Thr	Arg	Gln	Xaa	Tyr
	1				5					10					15

<210> 189  
 <211> 107

ES 2 604 012 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> anti-digoxigenin scdsFv VL

<400> 189

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95

10 Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 190  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> scdsFv VH anti-digoxigenina

20 <400> 190

ES 2 604 012 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Cys Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 191

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera kappa de anticuerpo anti-LeY

<400> 191

Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ile Ile Val His Ser  
 20 25 30

ES 2 604 012 T3

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 192  
 <211> 706  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena pesada de anticuerpo anti-LeY\_ds44-100scFvDig-Cys53

10 <400> 192

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr





ES 2 604 012 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val  
 450 455 460

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser  
 465 470 475 480

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Ser Trp Ile  
 485 490 495

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Ile  
 500 505 510

Cys Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
 515 520 525

ES 2 604 012 T3

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 530 535 540

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Ser  
 545 550 555 560

Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Tyr Trp Gly Gln  
 565 570 575

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 580 585 590

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser  
 595 600 605

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala  
 610 615 620

Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 625 630 635 640

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ser Ser Thr Leu Leu Ser Gly  
 645 650 655

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu  
 660 665 670

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 675 680 685

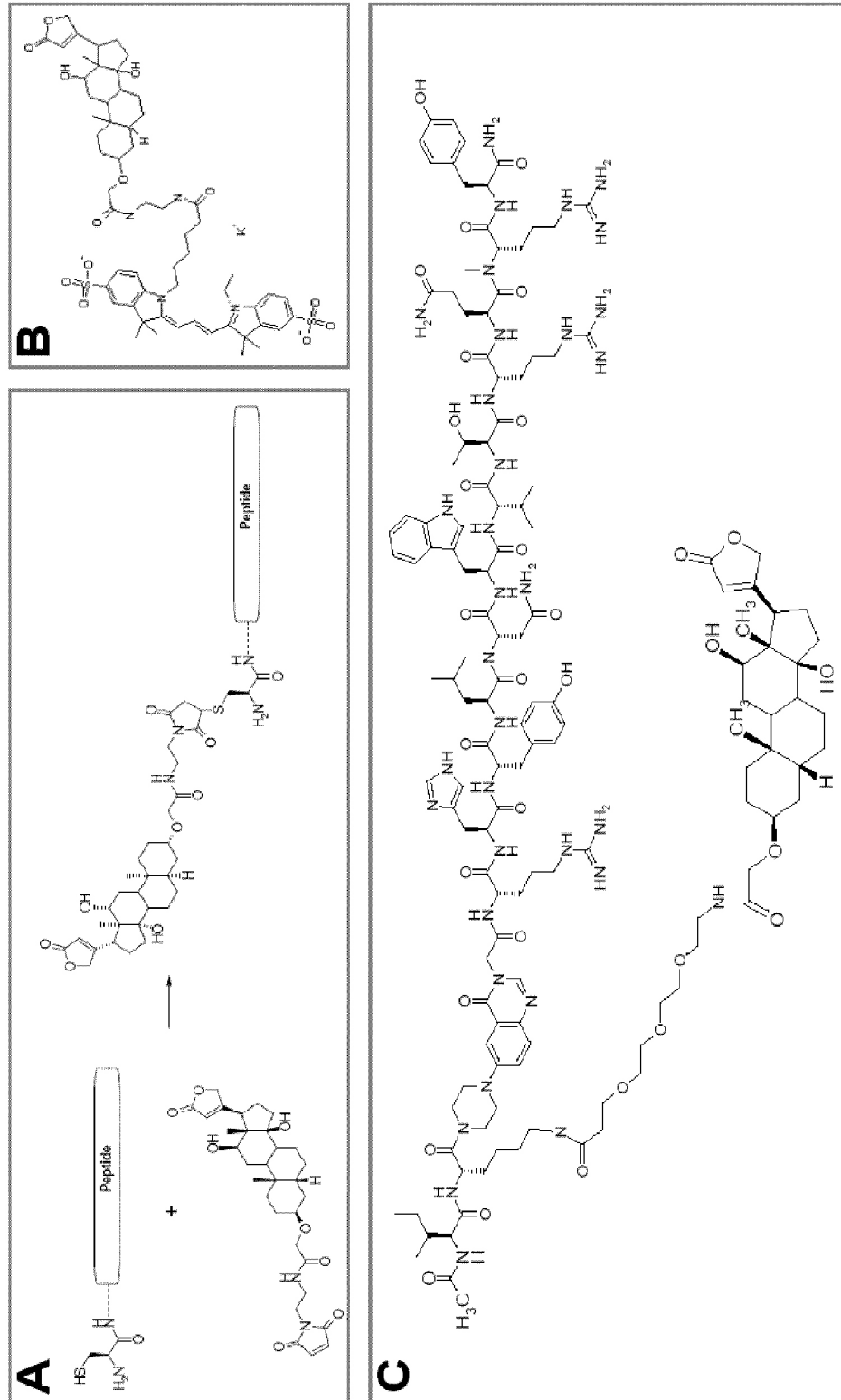
Gln Ser Ile Thr Leu Pro Pro Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu  
 690 695 700

Ile Lys  
 705

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Conjugado que comprende un antígeno o hapteno y un anticuerpo que se une específicamente al antígeno o hapteno, en el que un enlace covalente se establece entre un residuo de cisteína en la posición 52b o en la posición 53 según la numeración de Kabat del dominio variable de cadena pesada en la RDC2 de cadena pesada del anticuerpo y el antígeno o hapteno.
- 10 2. Conjugado según la reivindicación anterior, caracterizado por que el enlace covalente es un enlace disulfuro.
3. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera especificidad de unión para un primer antígeno o un primer hapteno y una segunda especificidad de unión para un segundo antígeno o un segundo hapteno.
- 15 4. Conjugado según la reivindicación 3, caracterizado por que la primera especificidad de unión es a un hapteno y una segunda especificidad de unión es a un antígeno no hapteno.
- 20 5. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
6. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 25 7. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el conjugado comprende además una fracción terapéutica o detectable.
8. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el hapteno se selecciona de entre el grupo de haptenos que comprende biotina, teofilina, digoxigenina, carborano y fluoresceína.
- 30 9. Anticuerpo que presenta en la cadena pesada un residuo de cisteína en la RDC2 de cadena pesada del anticuerpo en la posición 52b o en la posición 53 según la numeración de Kabat del dominio variable de cadena pesada.
- 35 10. Formulación farmacéutica que comprende el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Figure 1



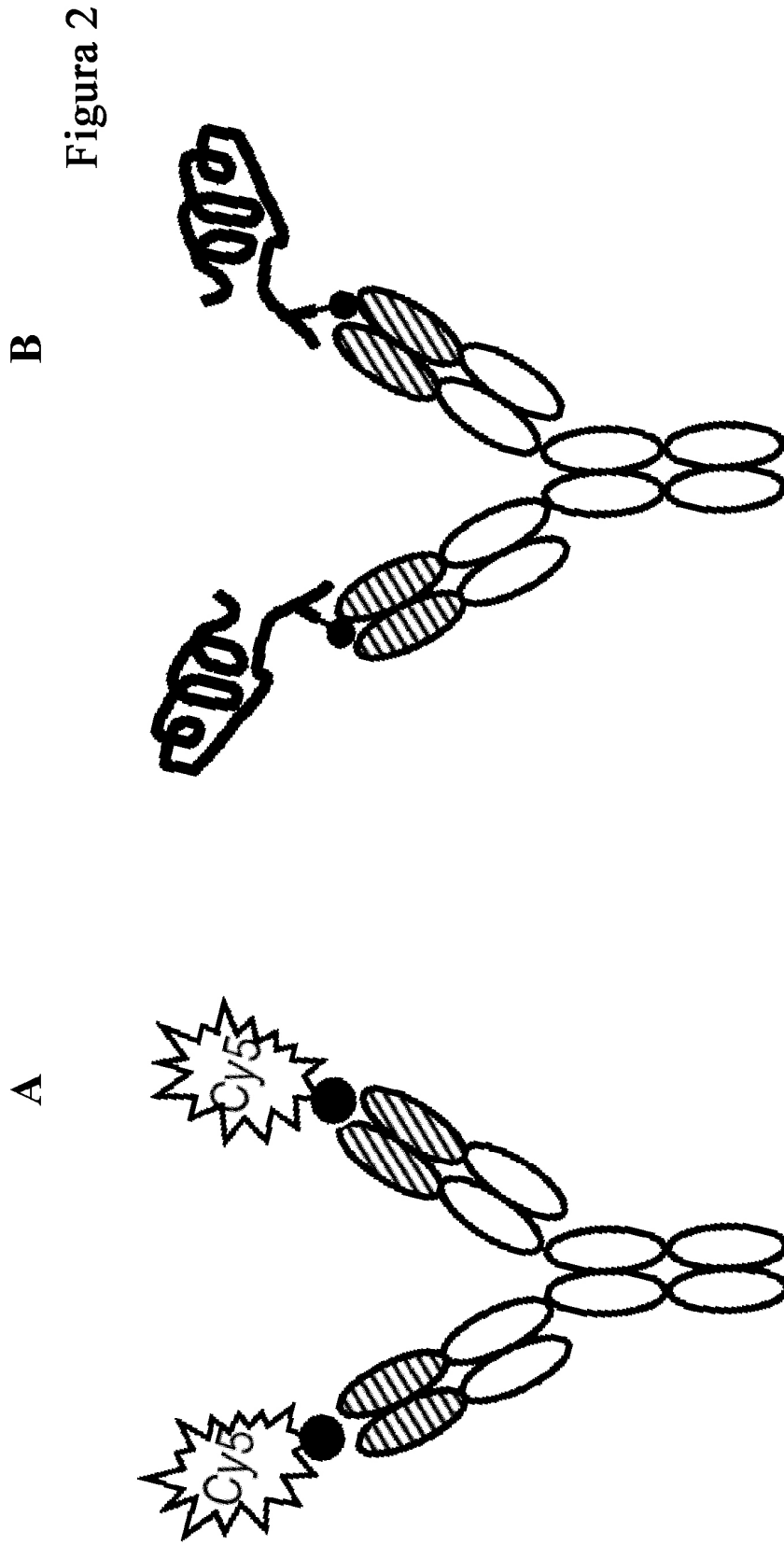
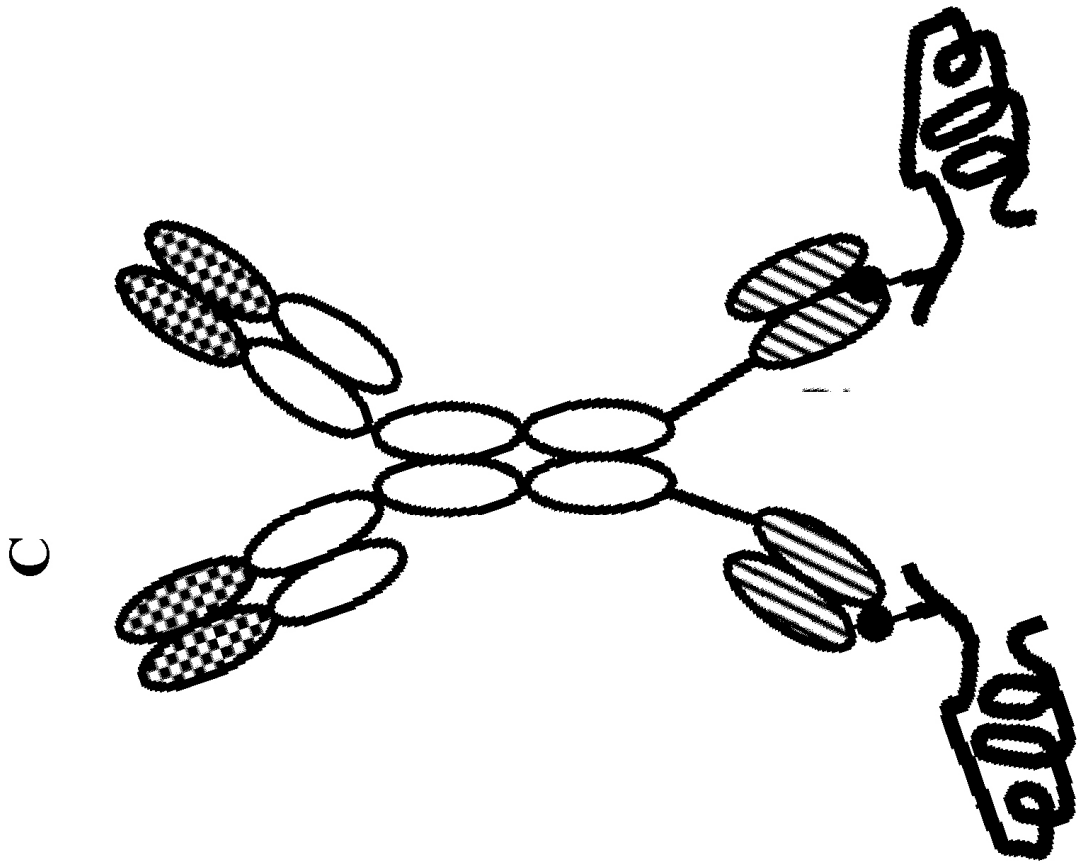


Figura 2



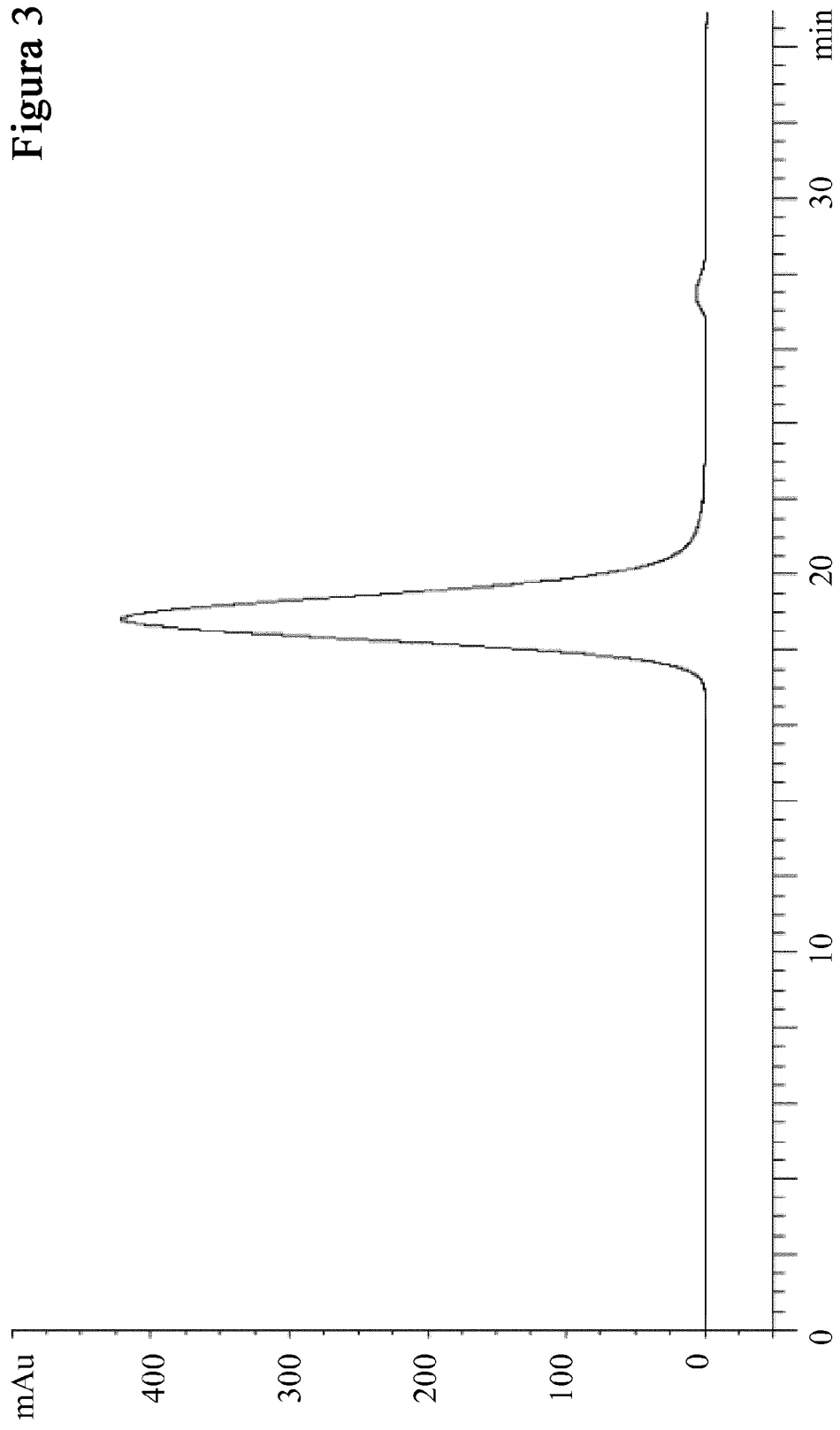




Figura 4

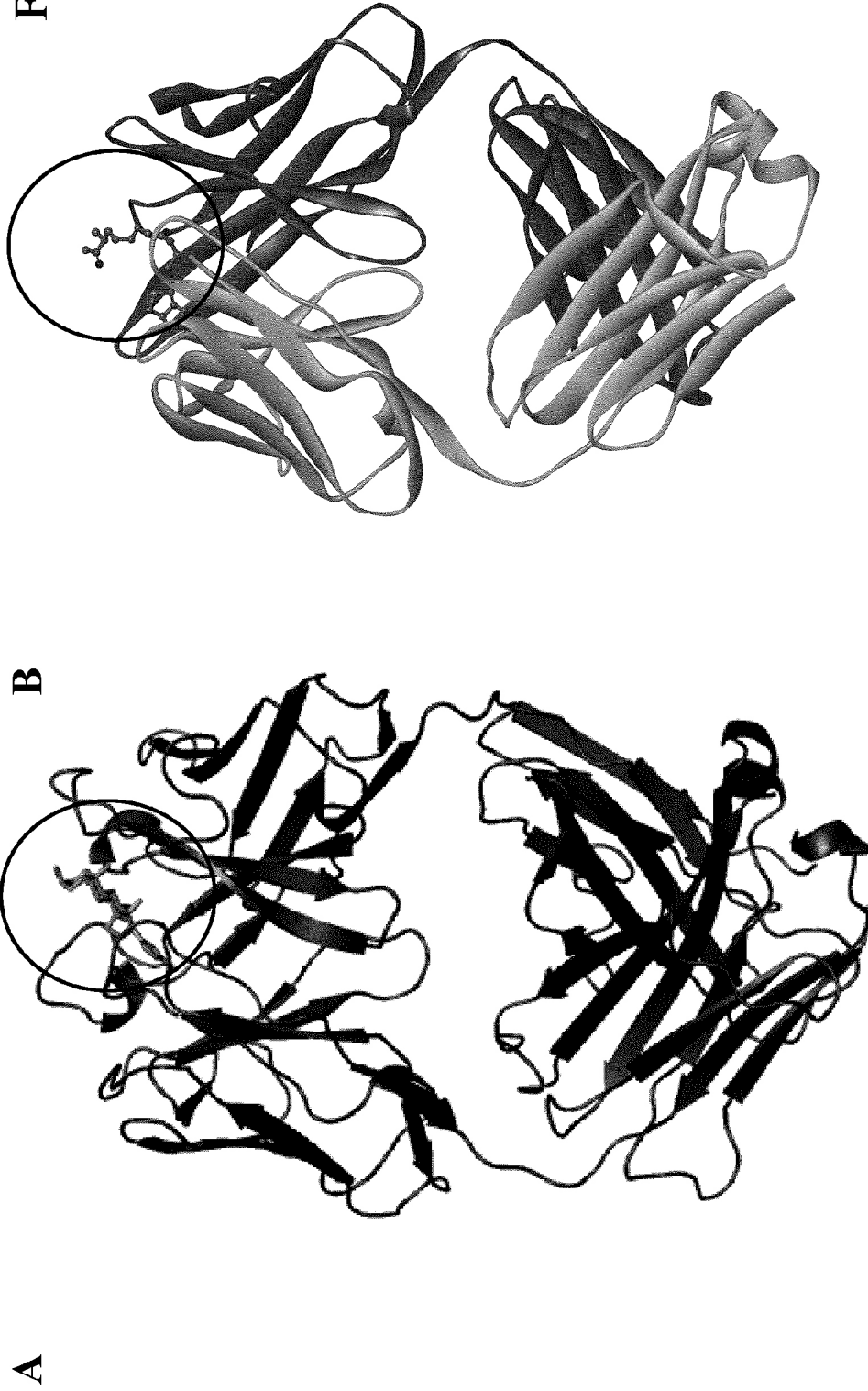


Figura 5

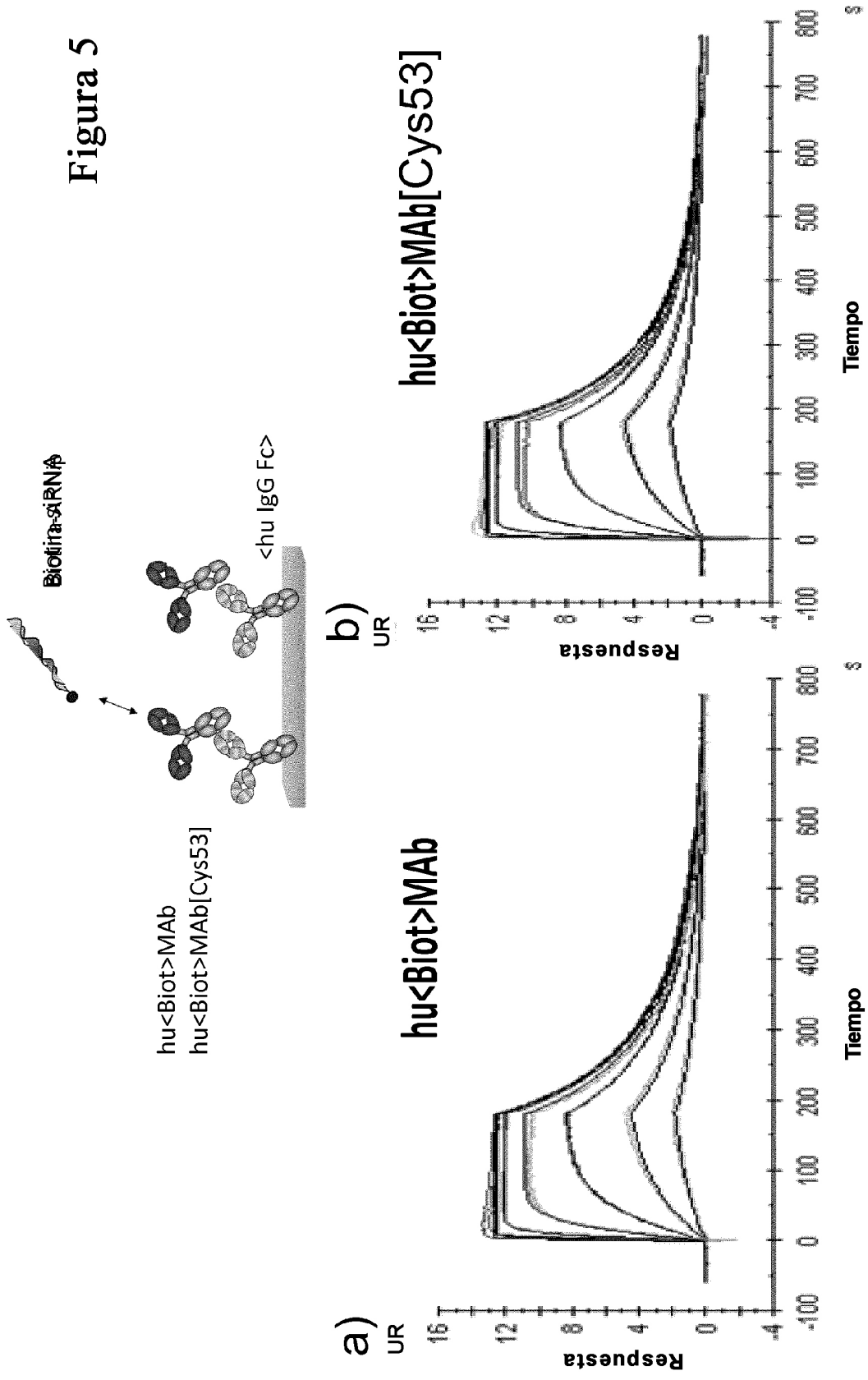


Figura 6

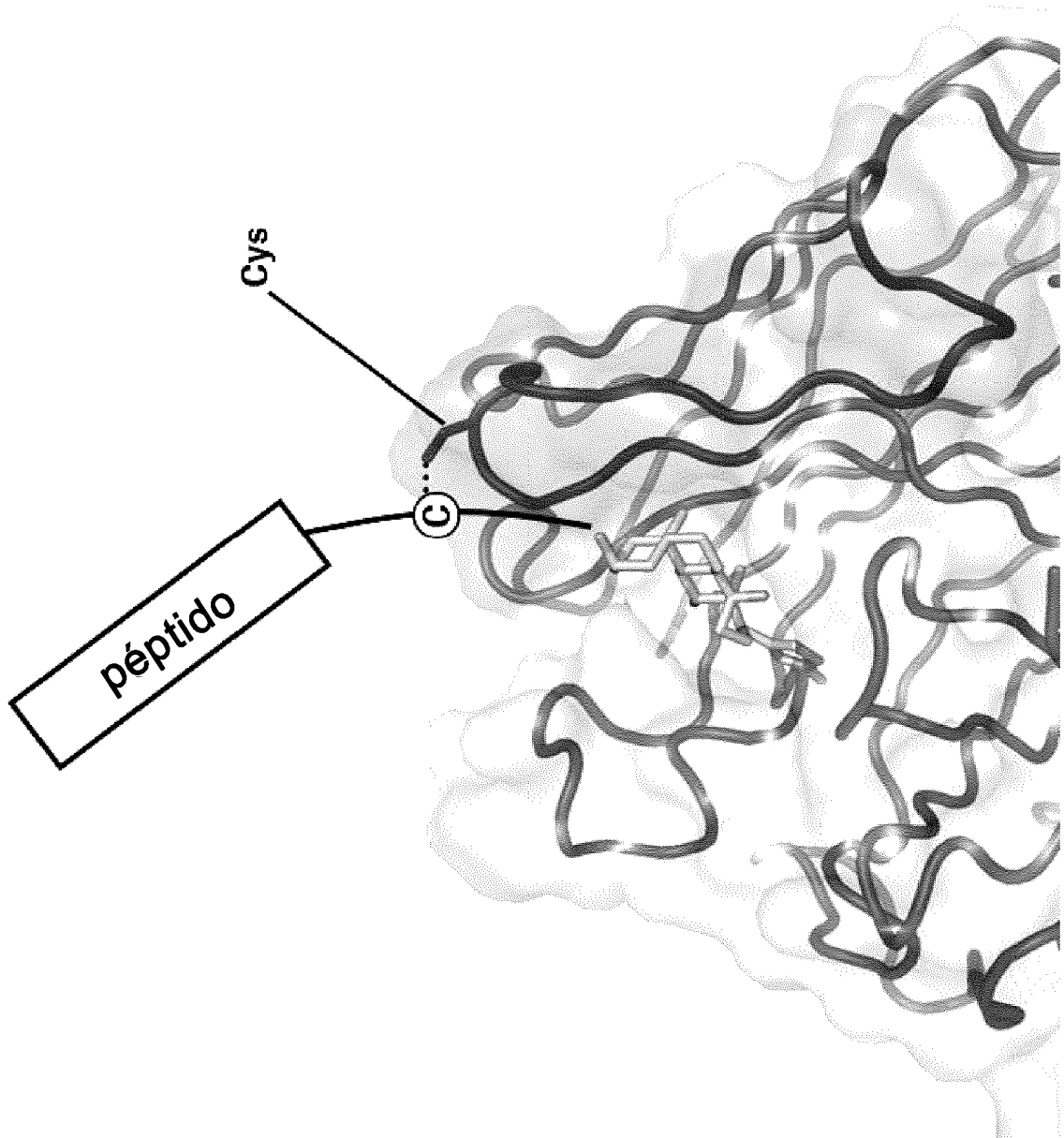
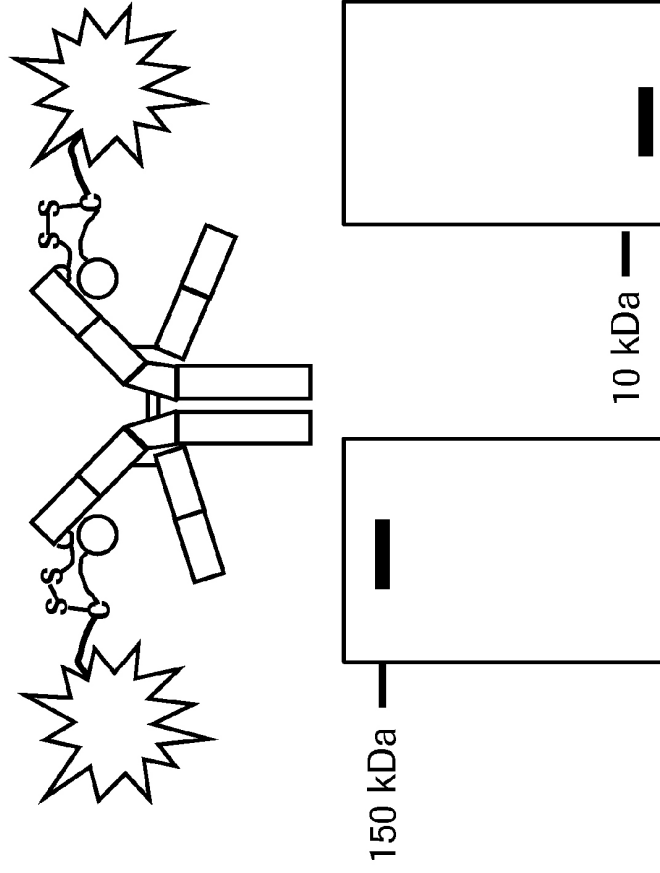


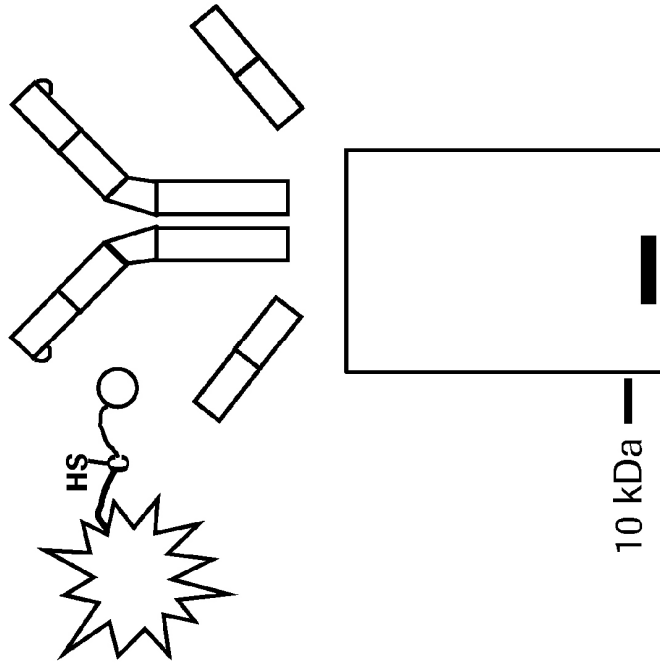
Figura 7

B



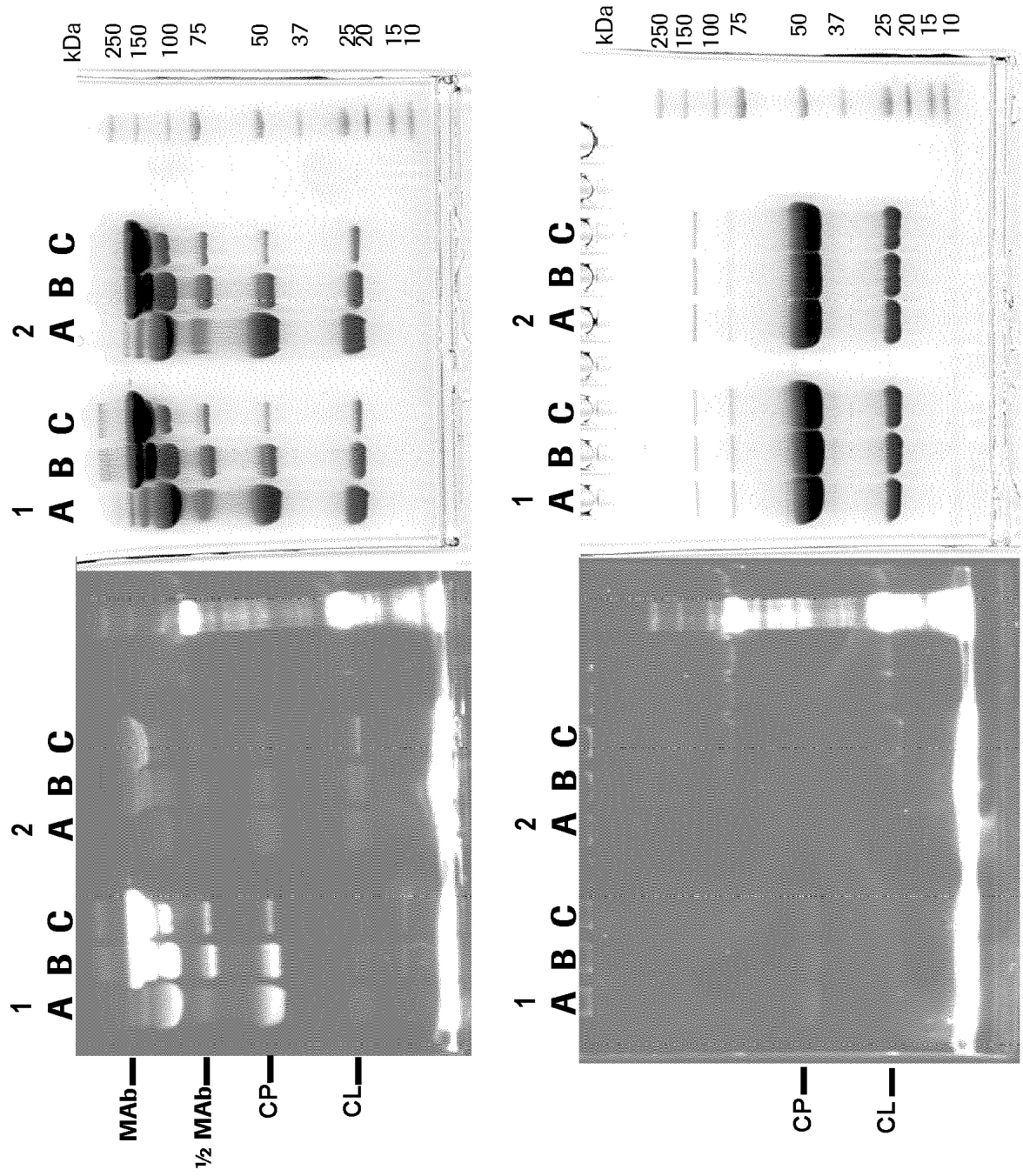
condiciones de SDS-PAGE  
reductoras no reductoras

A

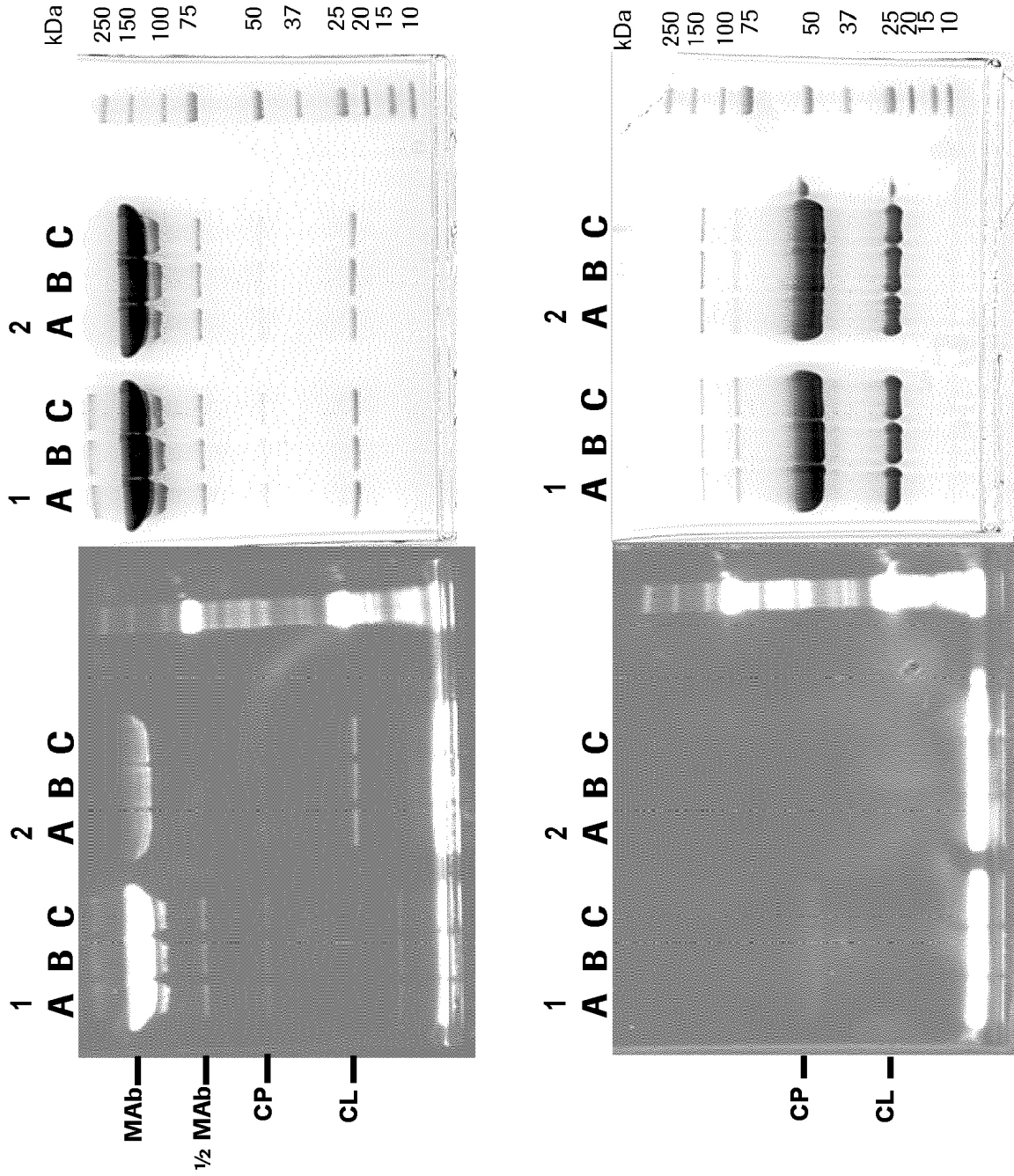


condiciones de SDS-PAGE  
reductoras y no reductoras

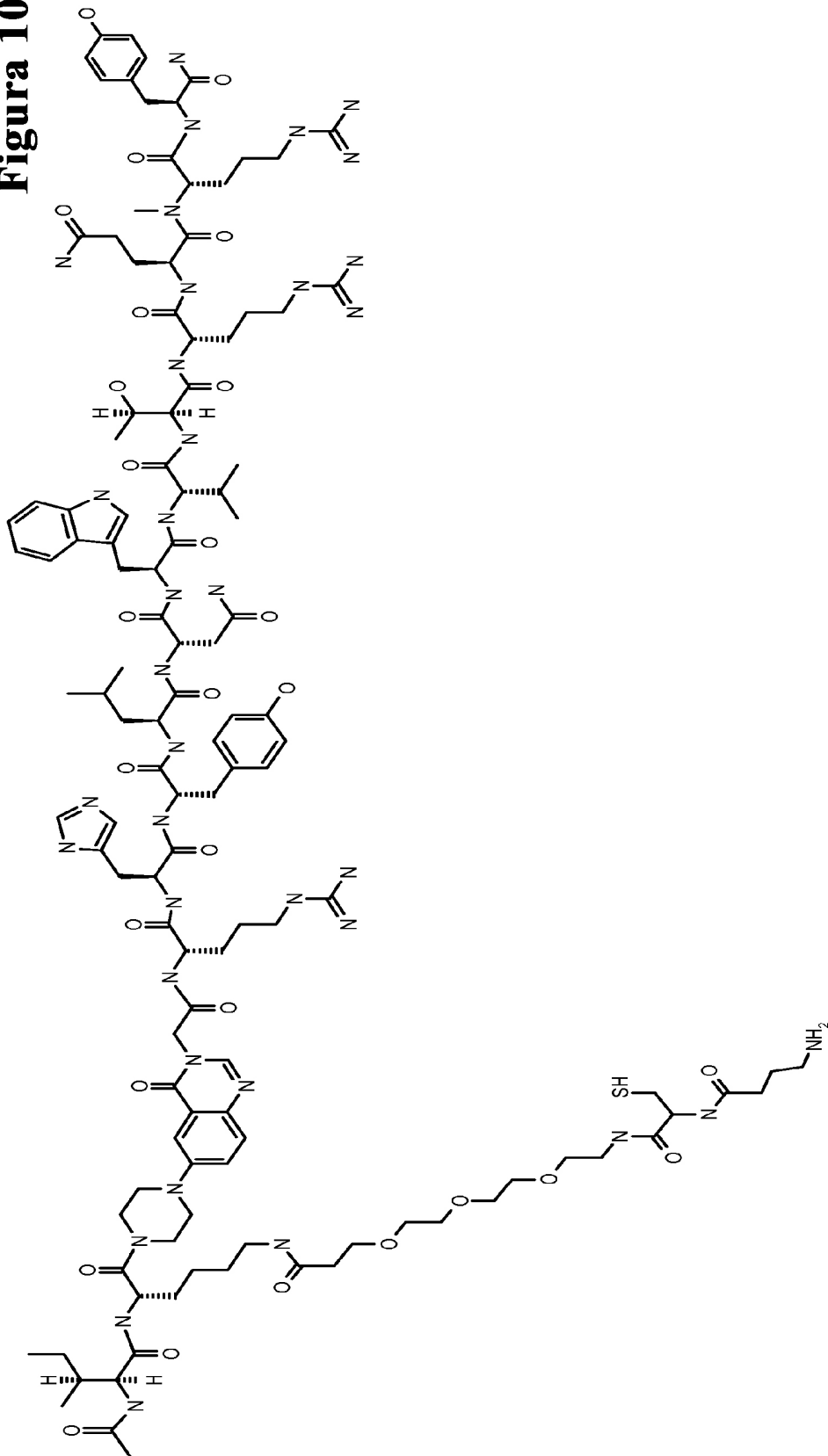
Figura 8

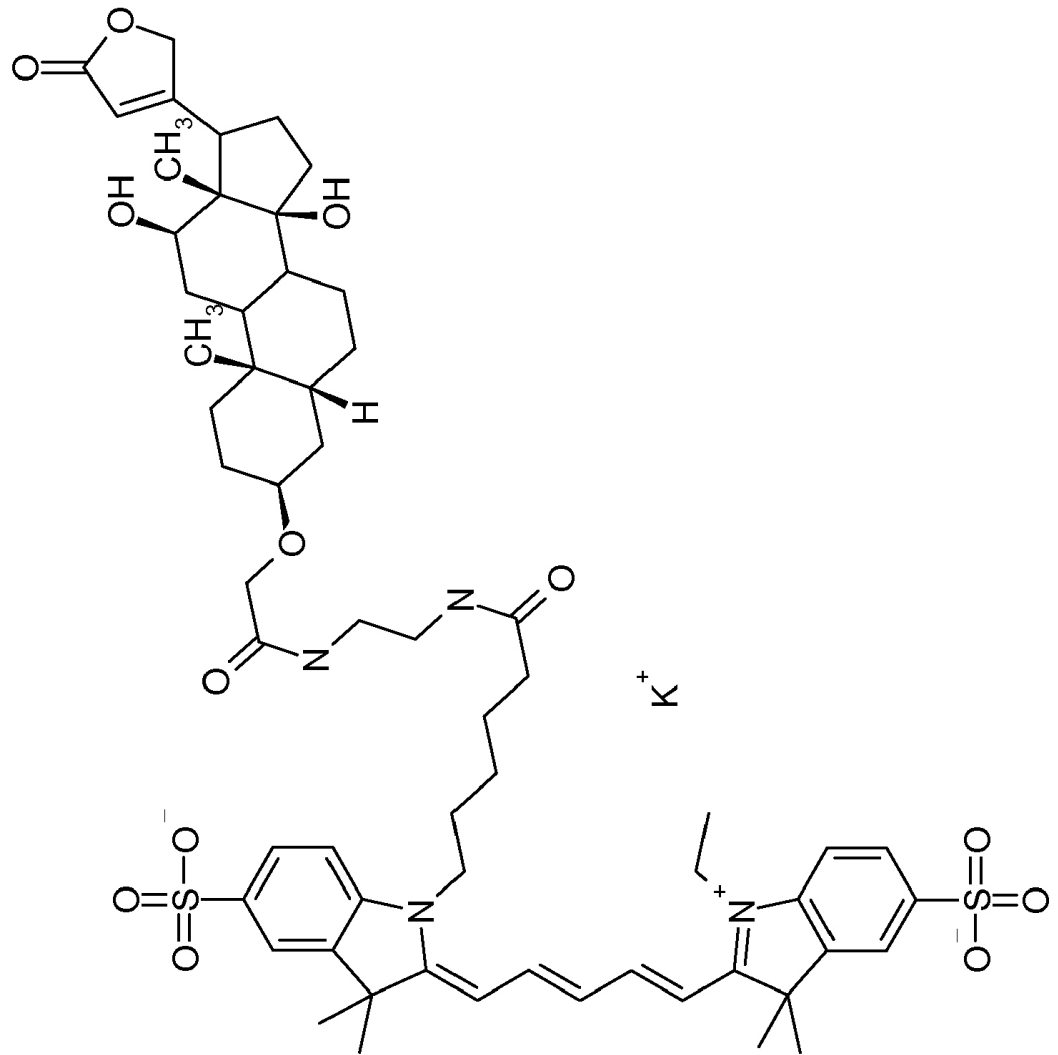


**Figura 9**



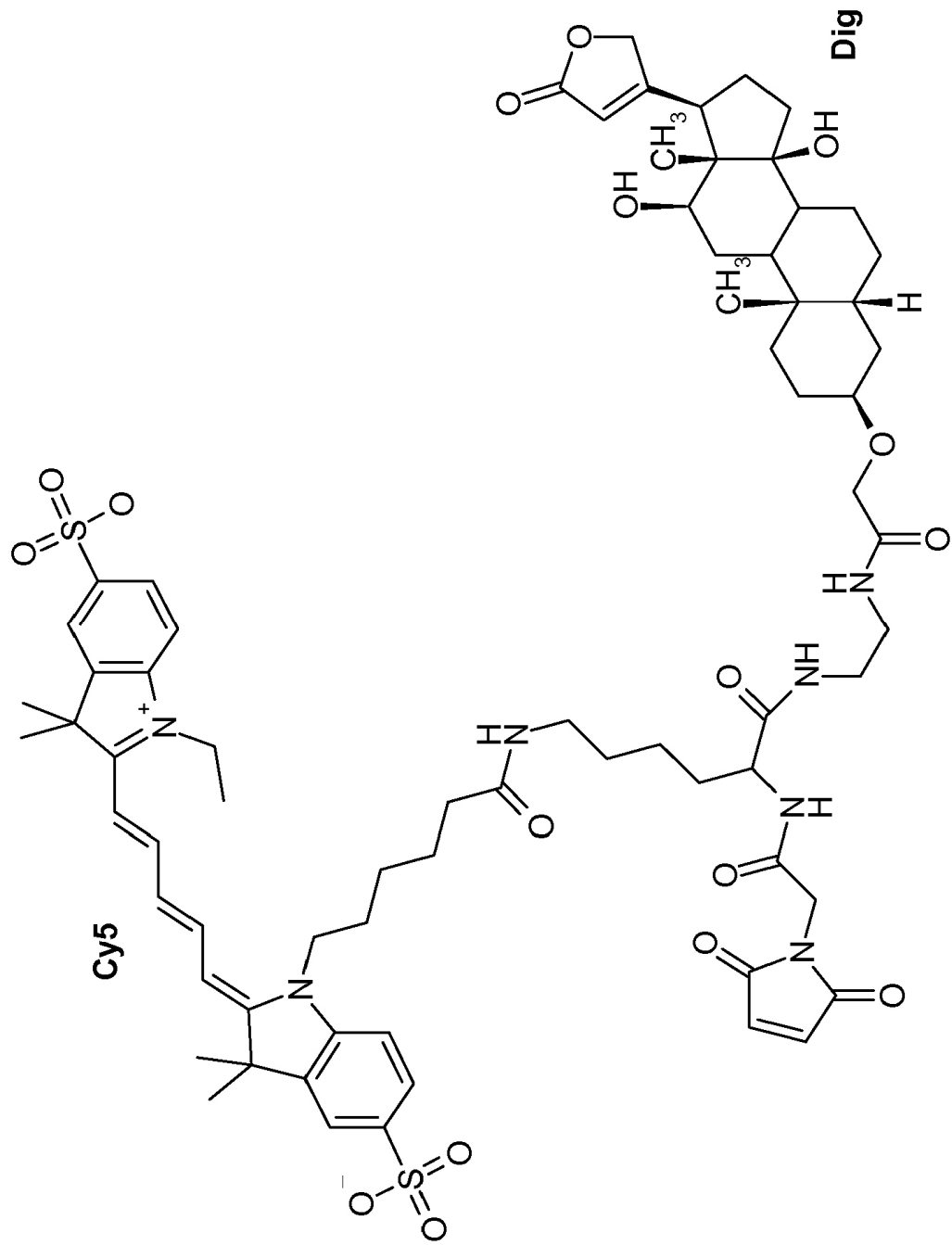
**Figura 10**



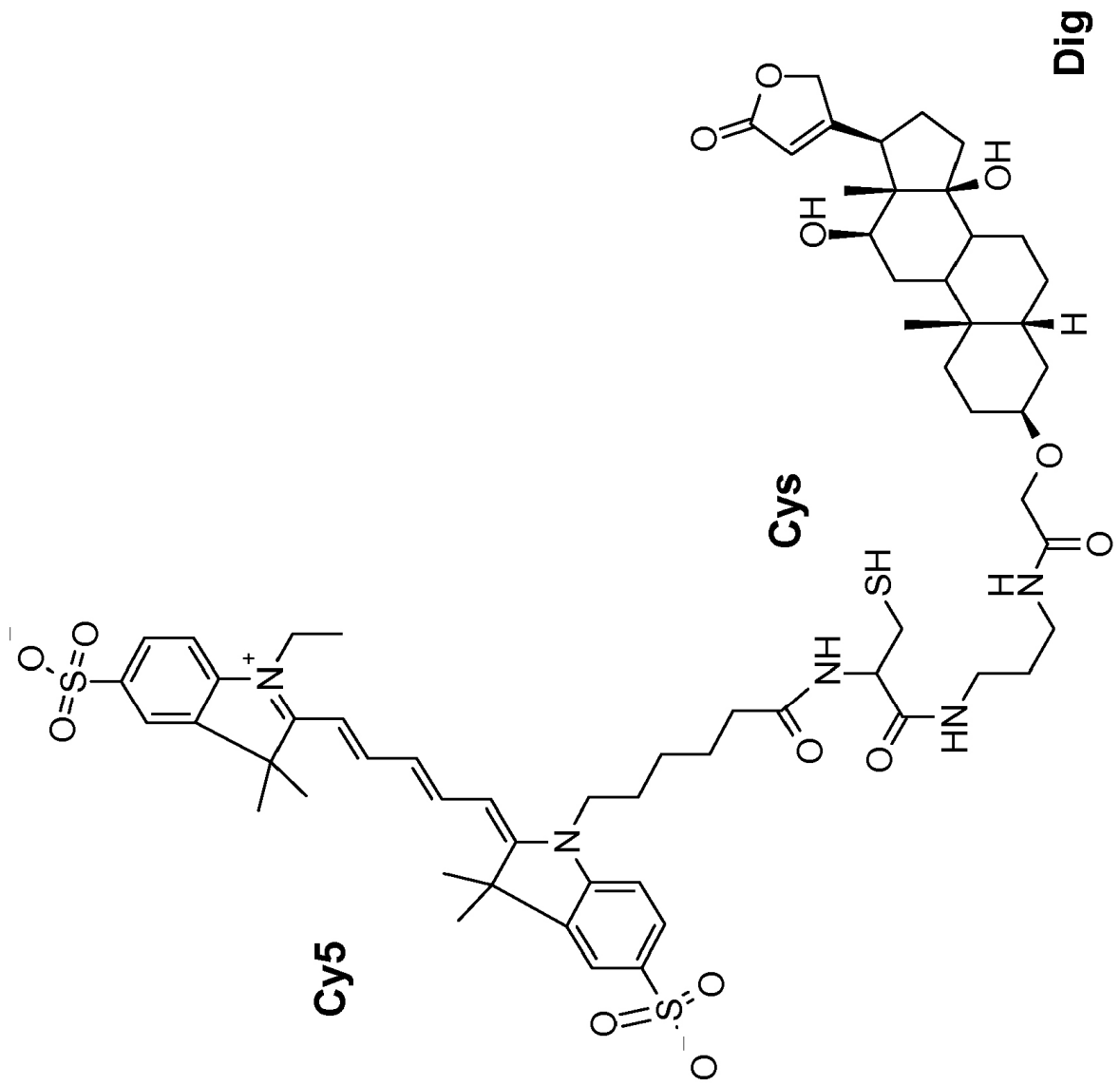
**Figura 11**



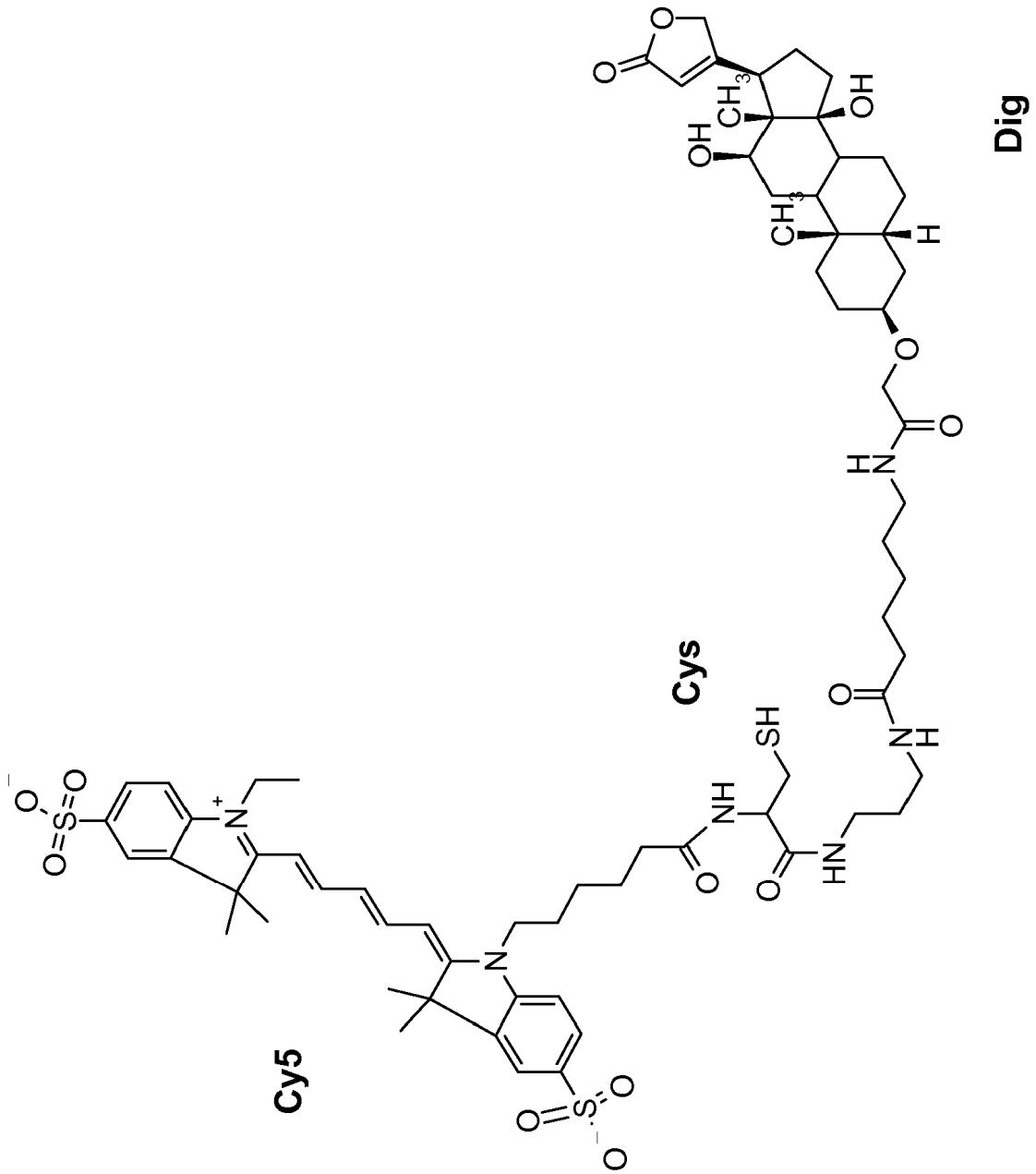
**Figura 12**



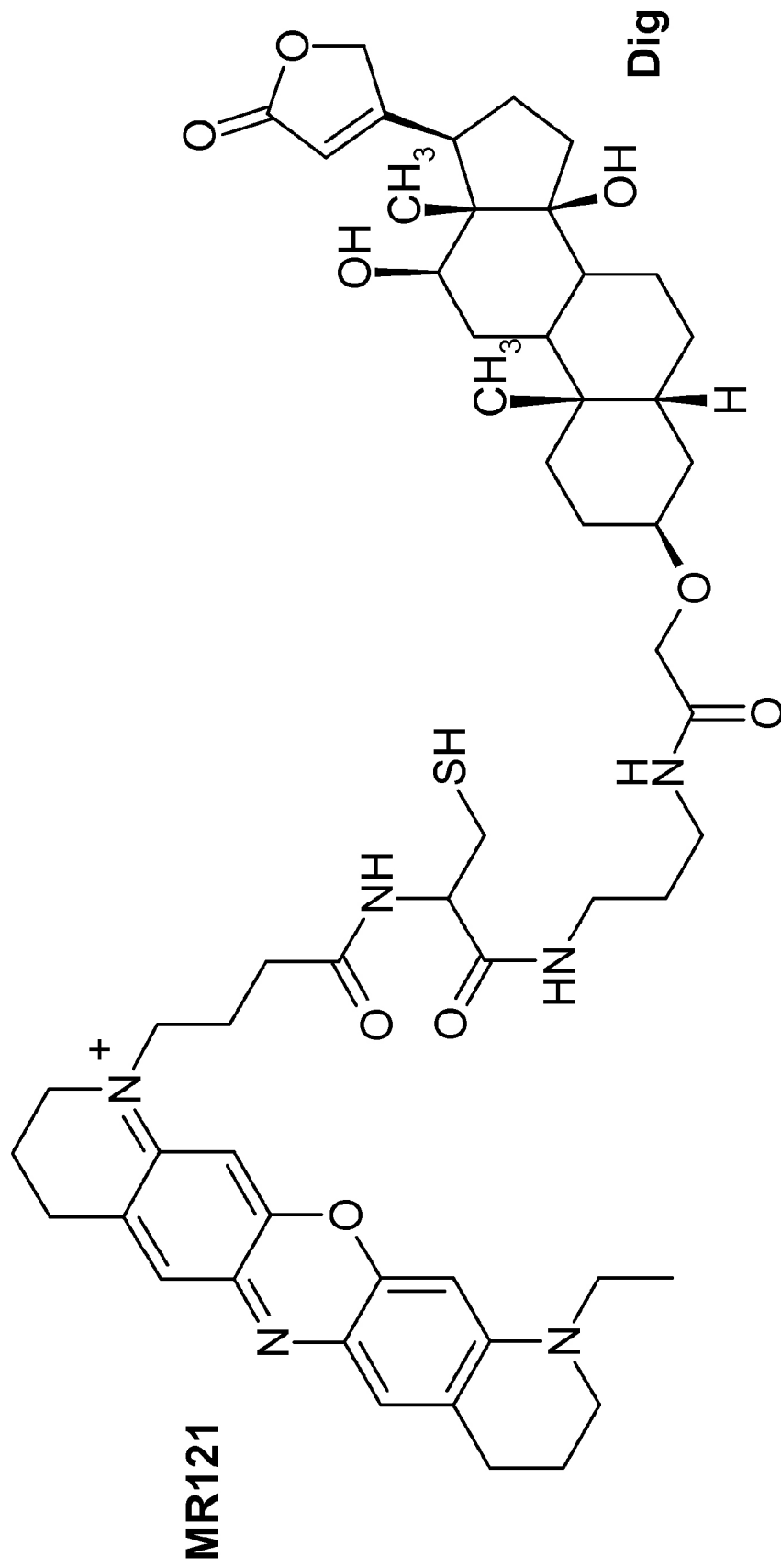
**Figura 13**



**Figura 14**

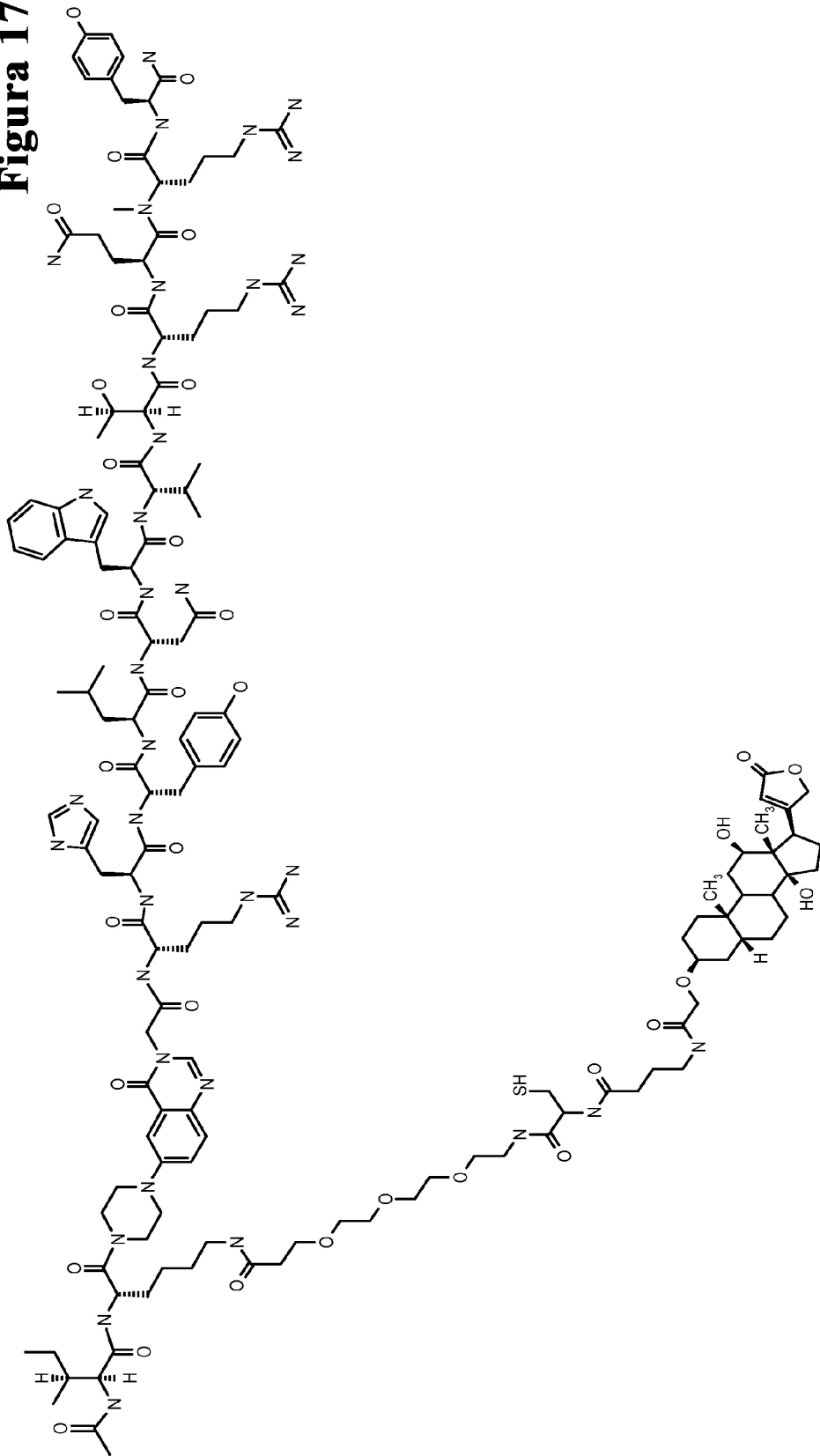


**Figura 15**

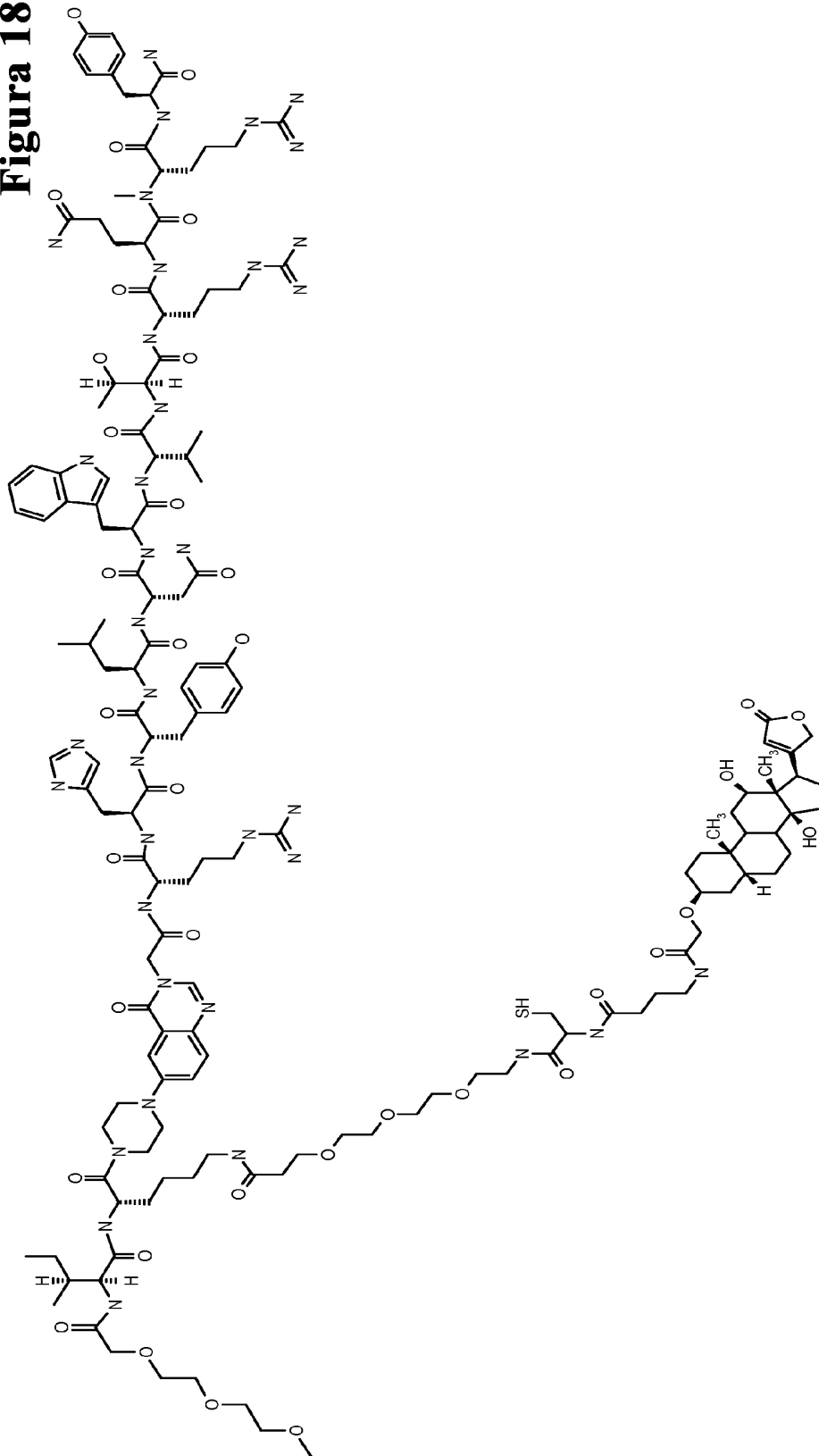




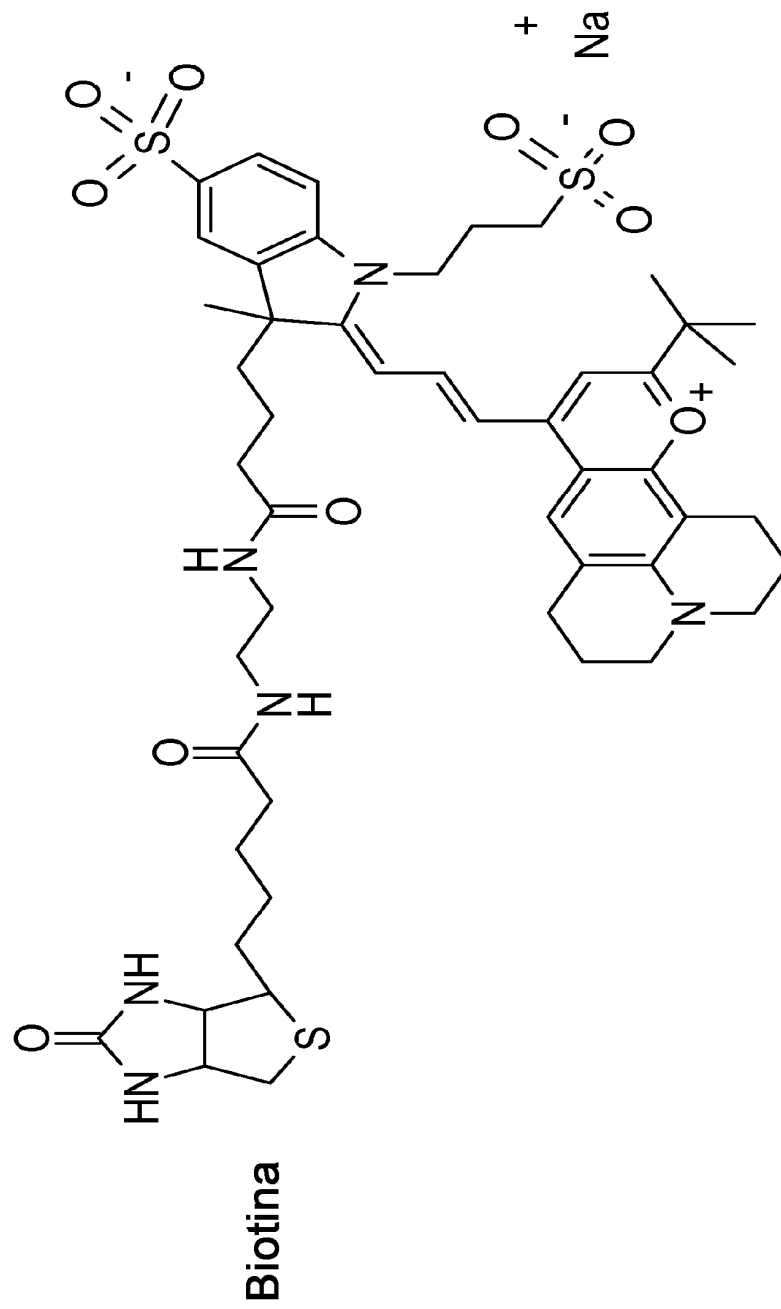
**Figura 17**



**Figure 18**

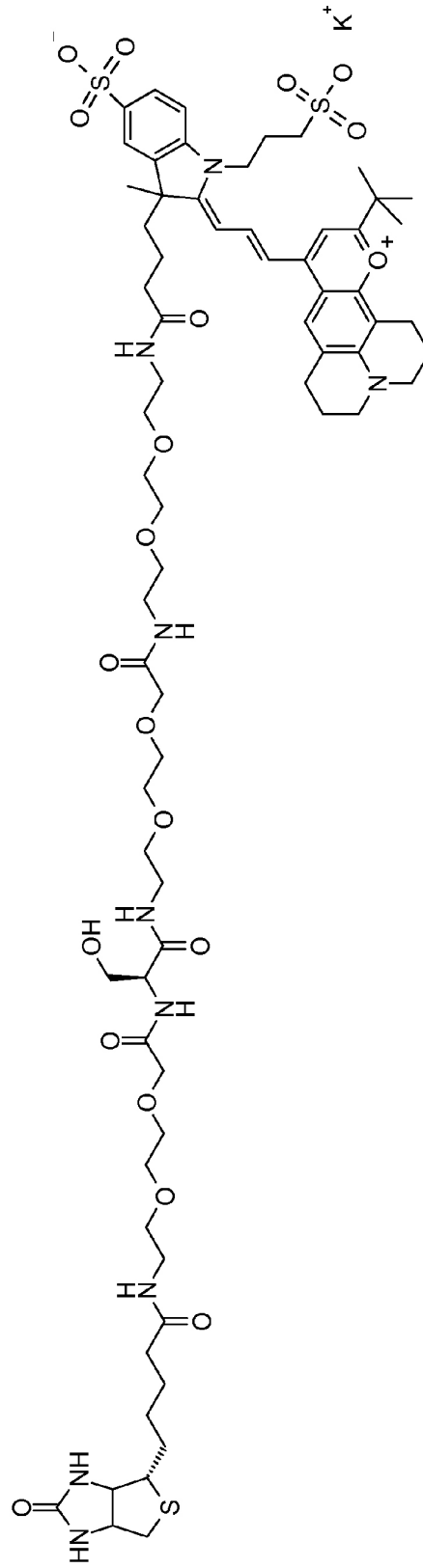


**Figura 19**

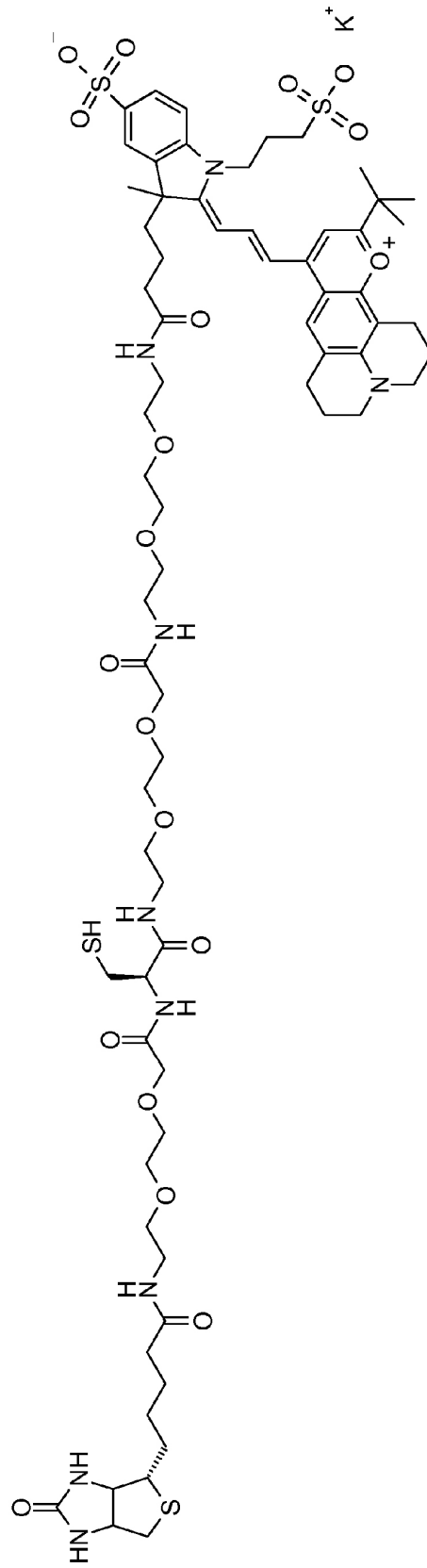


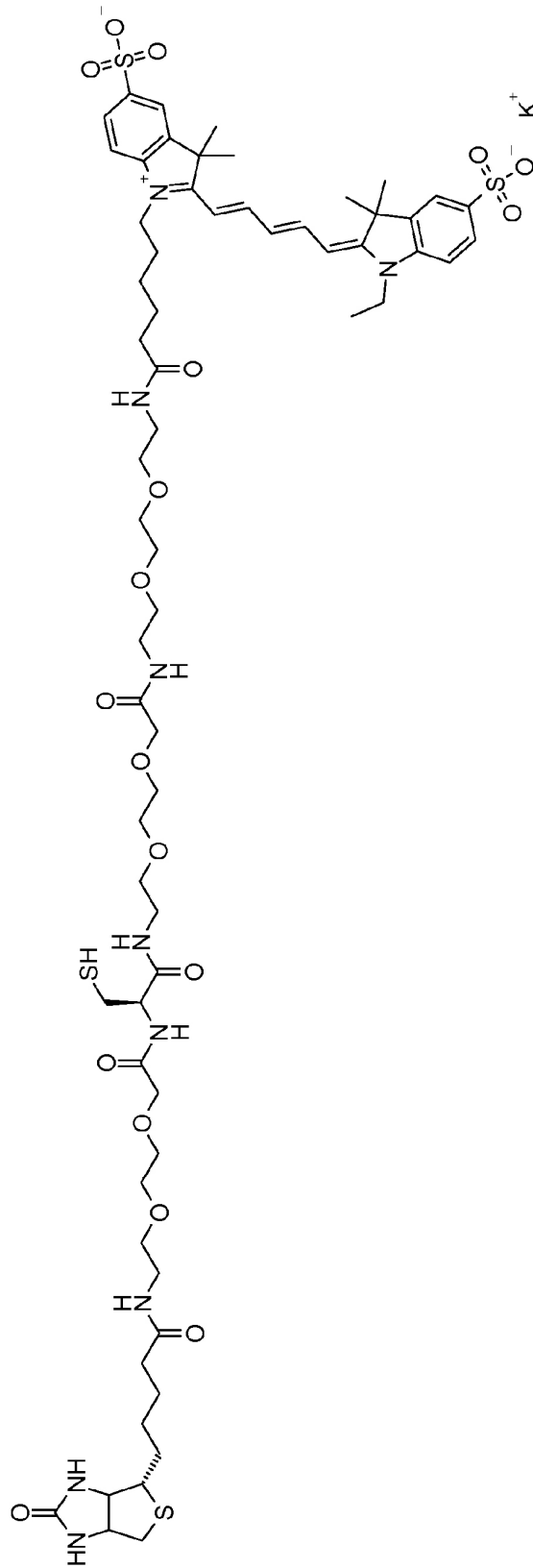


**Figura 20**

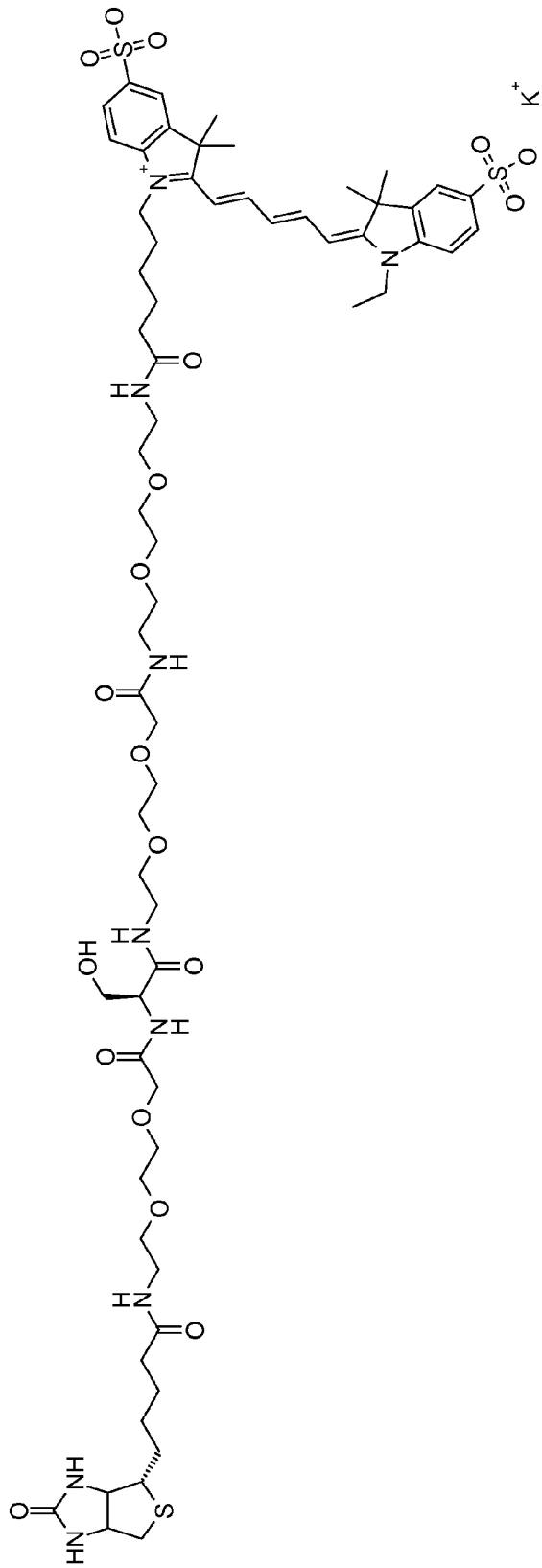


**Figura 21**

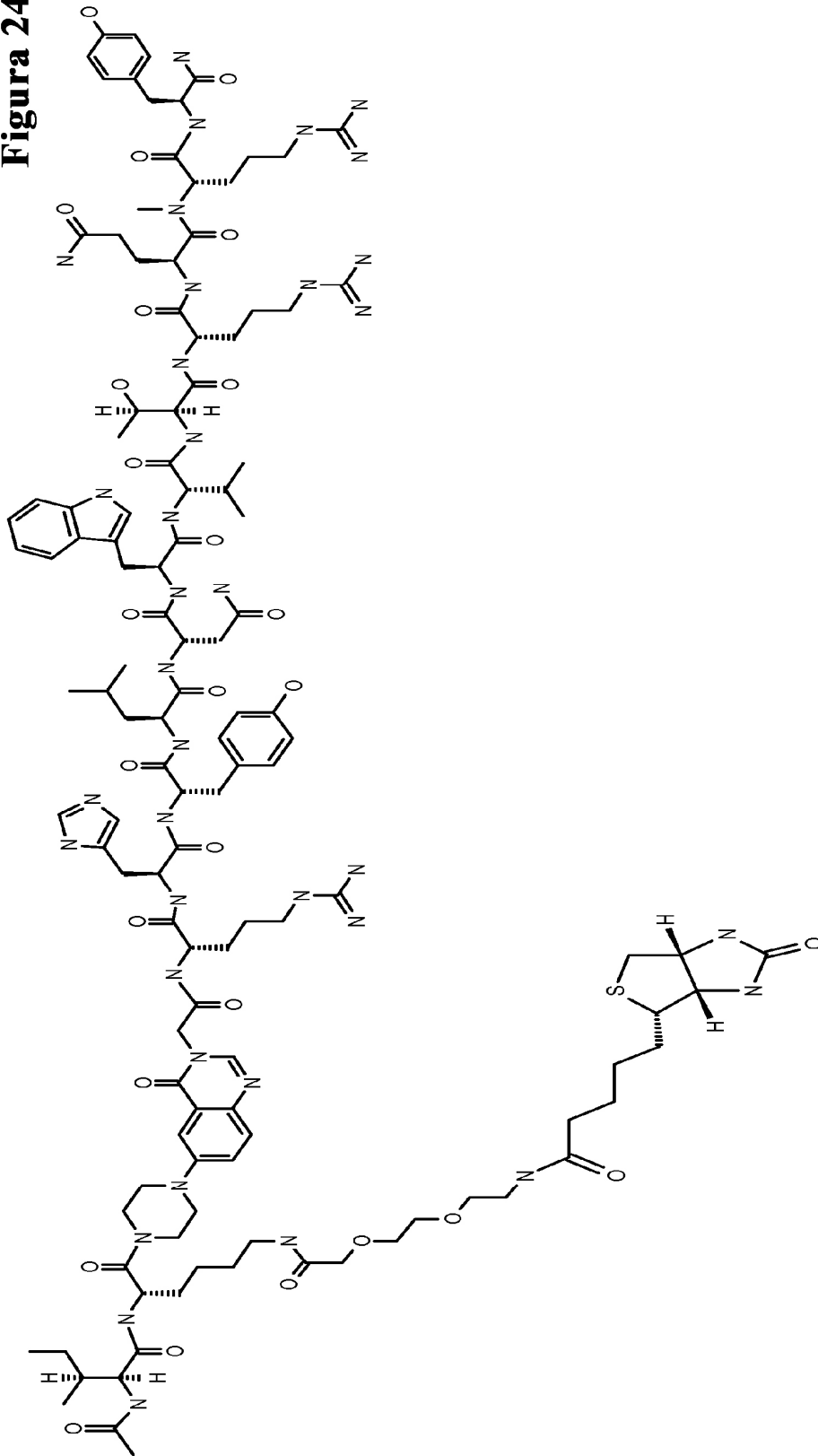


**Figura 22**

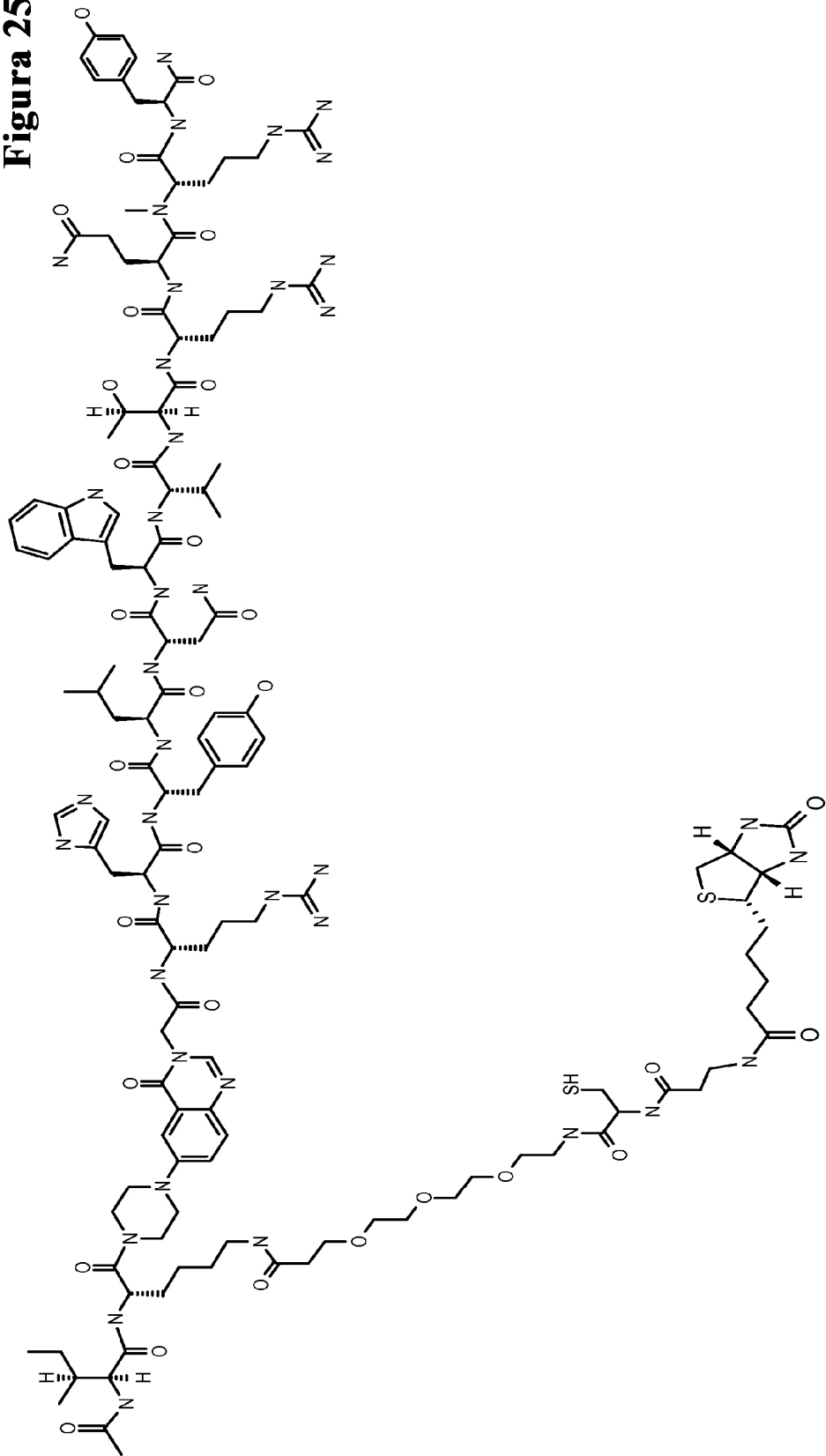
**Figura 23**



**Figura 24**



**Figura 25**



**Figura 26**

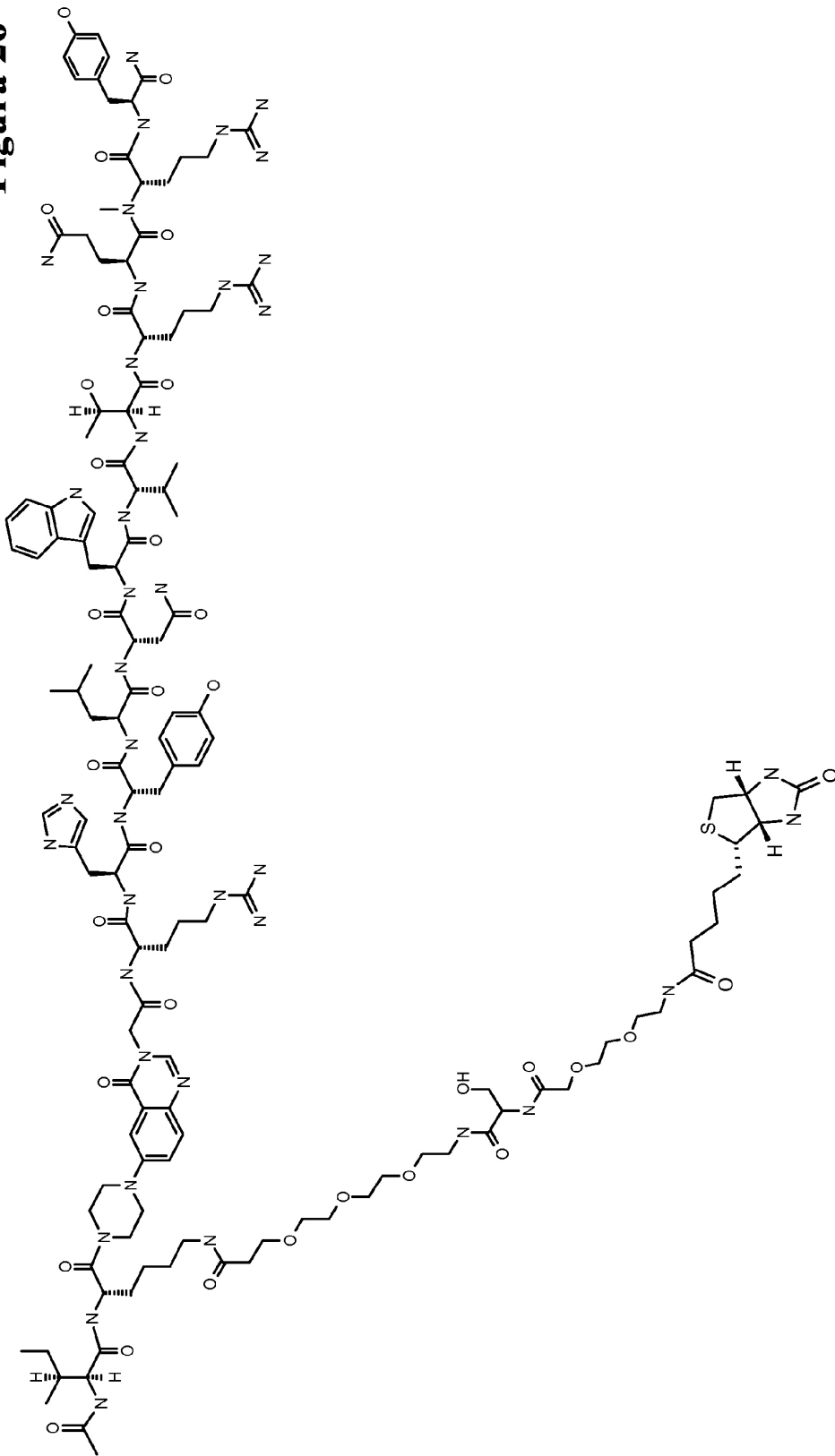
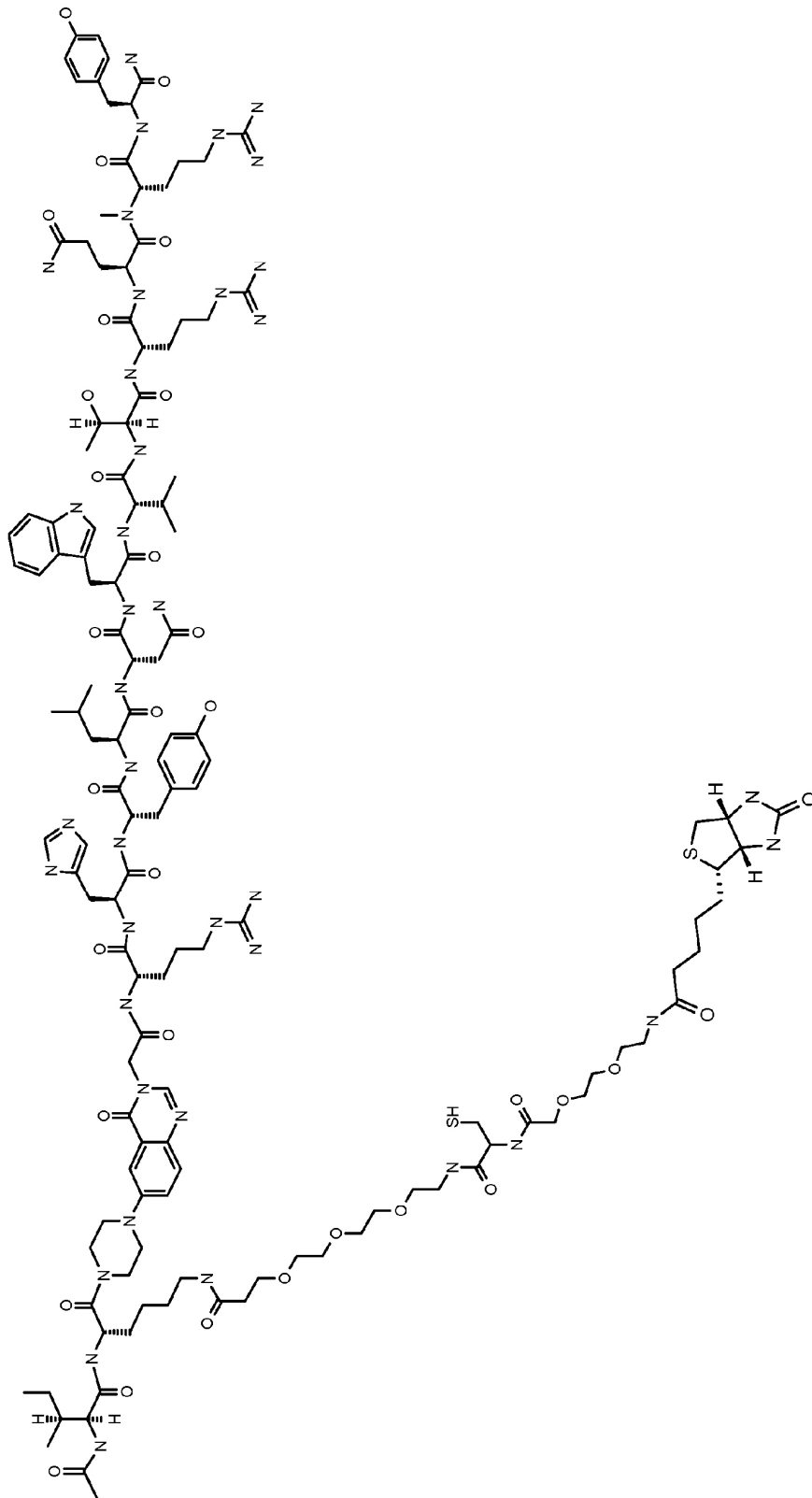


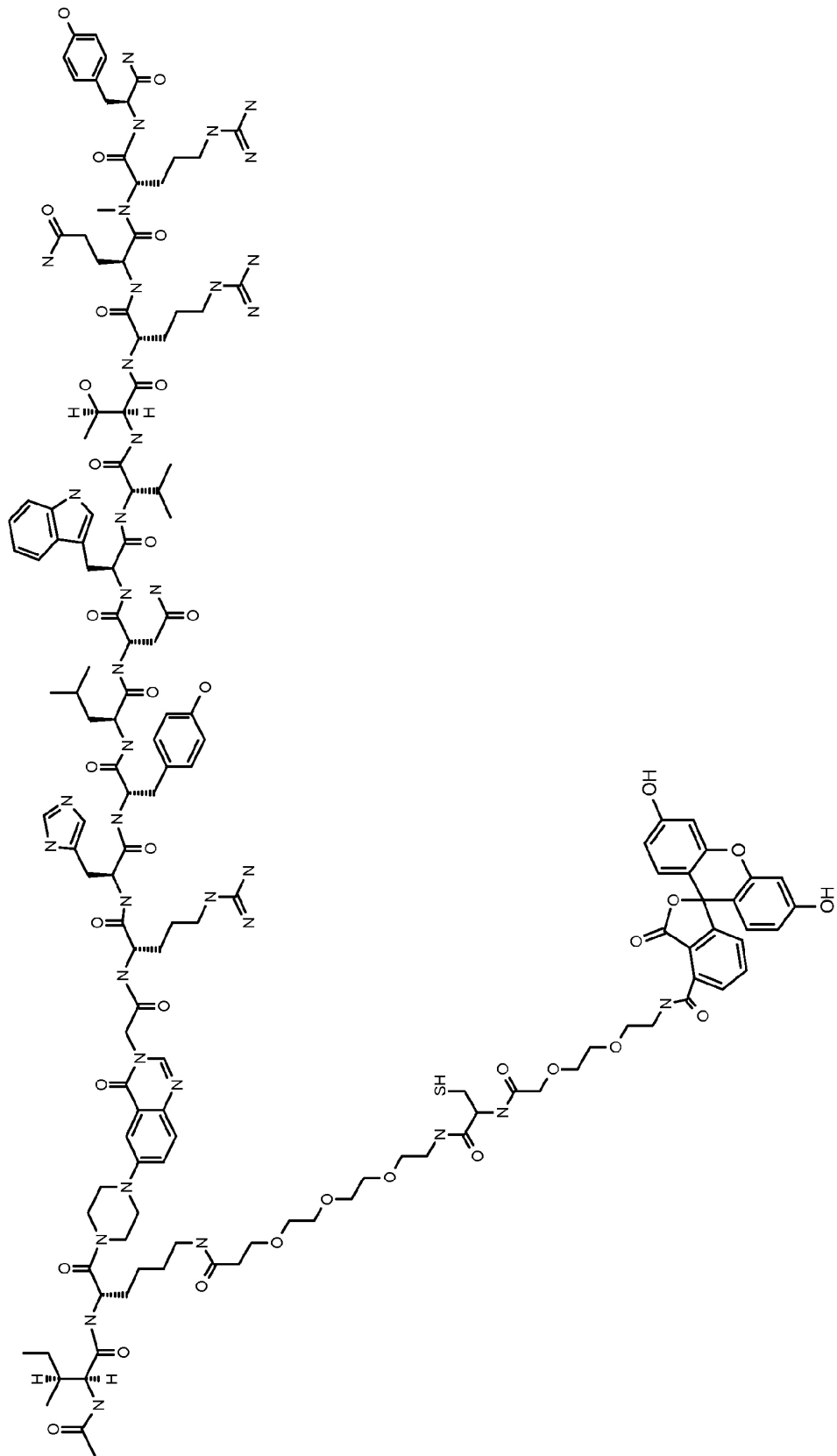
Figura 27







**Figura 29**



**Figura 30**

Ac-IK(Mmt)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S **resina RAM**  
 ↓  
 i) DCM/HFIP/TFE/ITIS (6,5:2:1:0,5), 2 x 1 h  
 ii) lavado con DMF

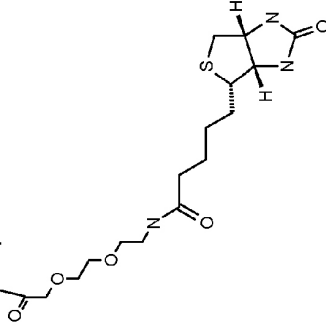
Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S **resina RAM**

↓  
 i) 3 eq. ácido Fmoc-8-amino-dioctanoico (PEG2)  
 ii) 30% Pfp/DMF  
 iii) 4 eq. biotina-CBt, preactivado 3 min.

Ac-IK(PEG2-Bin)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S **resina RAM**

↓  
 TFA/tioanisol/tiocresol/ITIS (95:2,5:2,5:3)

Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub>



## Figura 31

Ac-IK-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S resina RAM

i) 3 eq. ácido Fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (PEG3)  $\downarrow$   
 ii) 3 eq. HATU, 3 eq. NMM en 1,2 ml de DMF, 2 x 30 min.  
 iii) 30% Pip/DMF

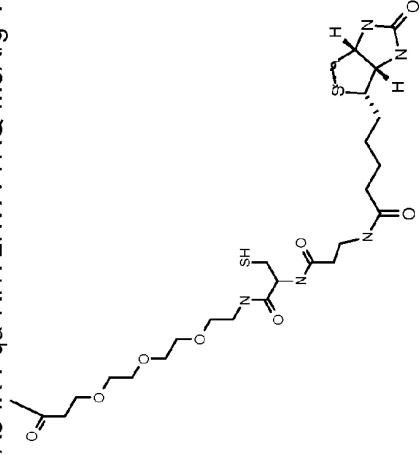
Ac-IK(PEG3)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S resina RAM

i) 2 eq. Fmoc-Cys(Trt)-OH  $\downarrow$   
 ii) 2 eq. TBTU, 2 eq. NMM, 2 x 30 min  
 iii) 30% Pip/DMF  
 iii) 2 eq. Fmoc- $\beta$ -Ala-OH  
 iv) 4 eq. Biotin-OBt, preactivados 3 min.  
 iv) 2 eq. TBTU, 2 eq. NMM, 2 x 30 min  
 iv) 4 eq. TBTU, 8 eq. NMM en 1,2 ml de NMP, 2 h

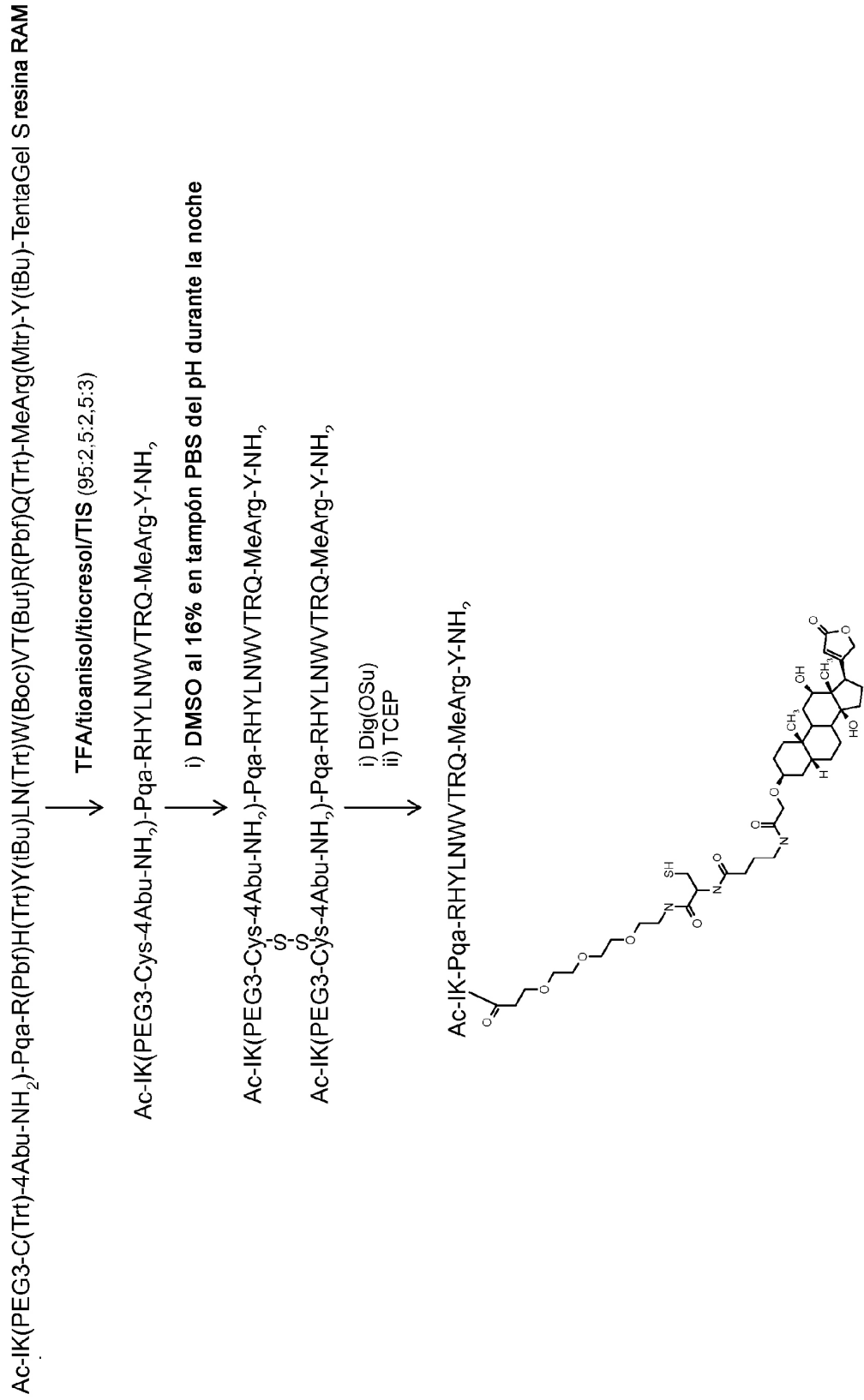
Ac-IK(PEG3-C(Trt)- $\beta$ -A-Btn)-Pqa-R(Pbf)H(Trt)Y(tBu)LN(Trt)W(Boc)VT(But)R(Pbf)Q(Trt)-MeArg(Mtr)-Y(tBu)-TentaGel S resina RAM

$\downarrow$  TFA/tioanisol/tiocresol/ITIS (95:2,5:2,5:3)

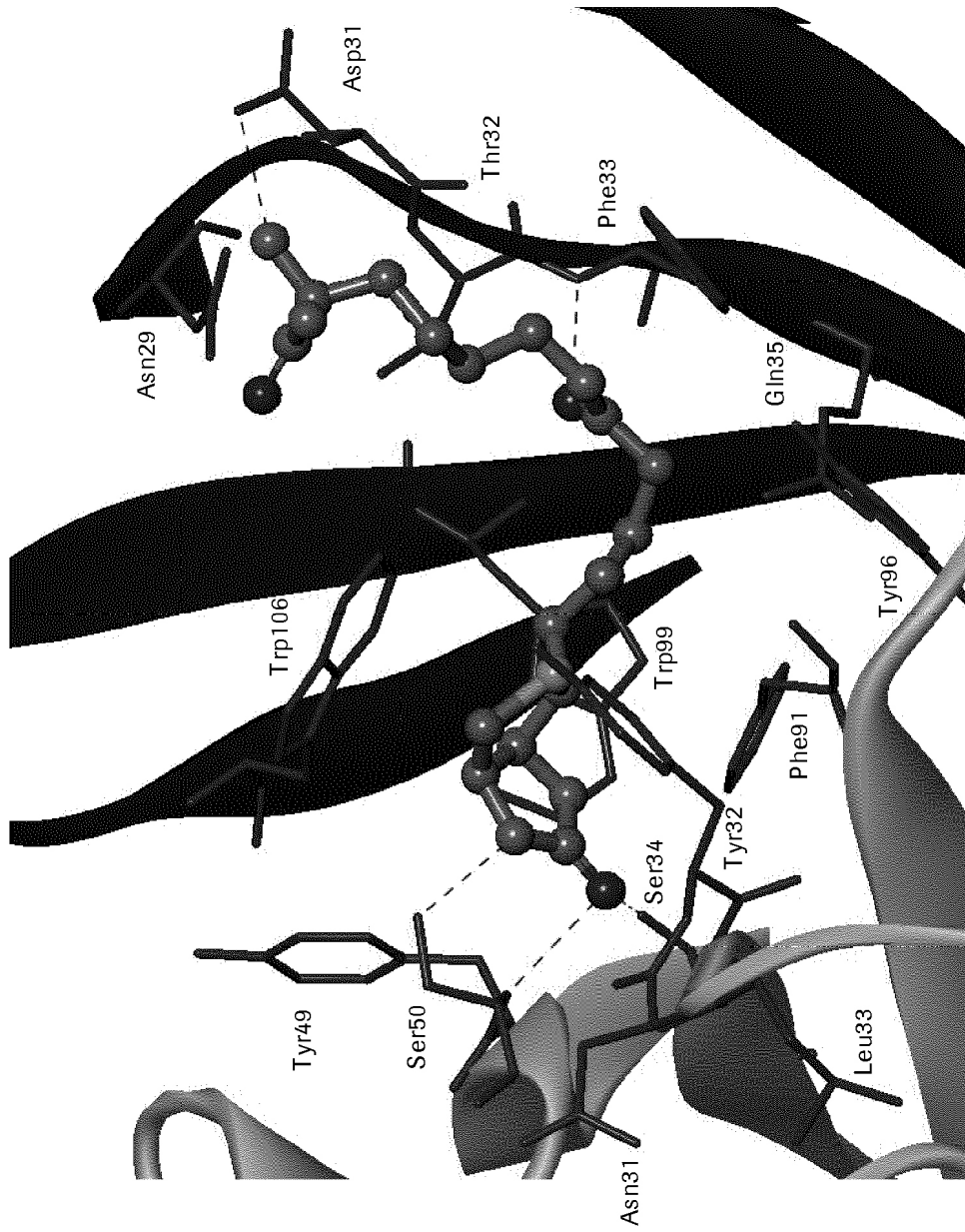
Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ-MeArg-Y-NH<sub>2</sub>



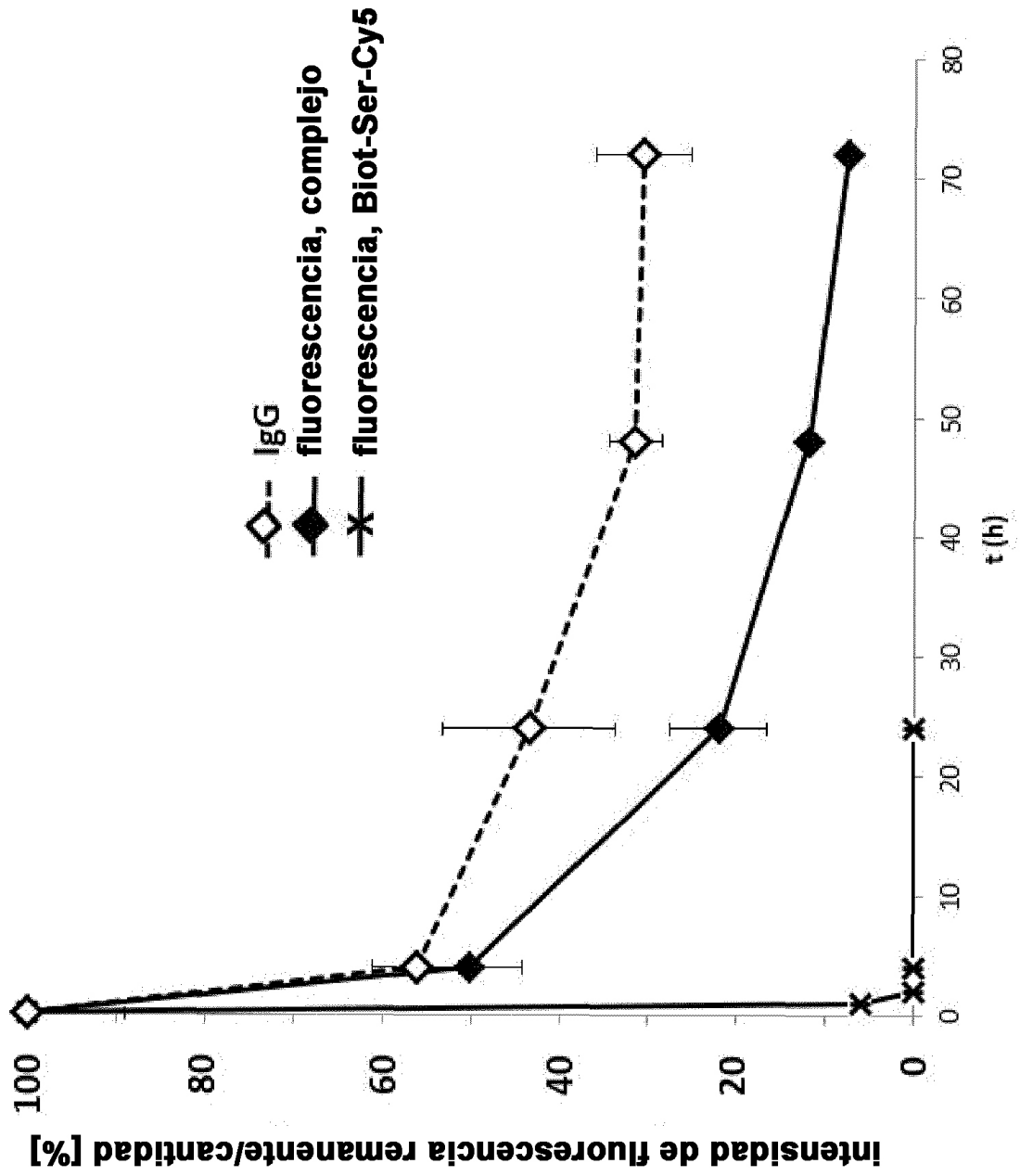
**Figura 32**



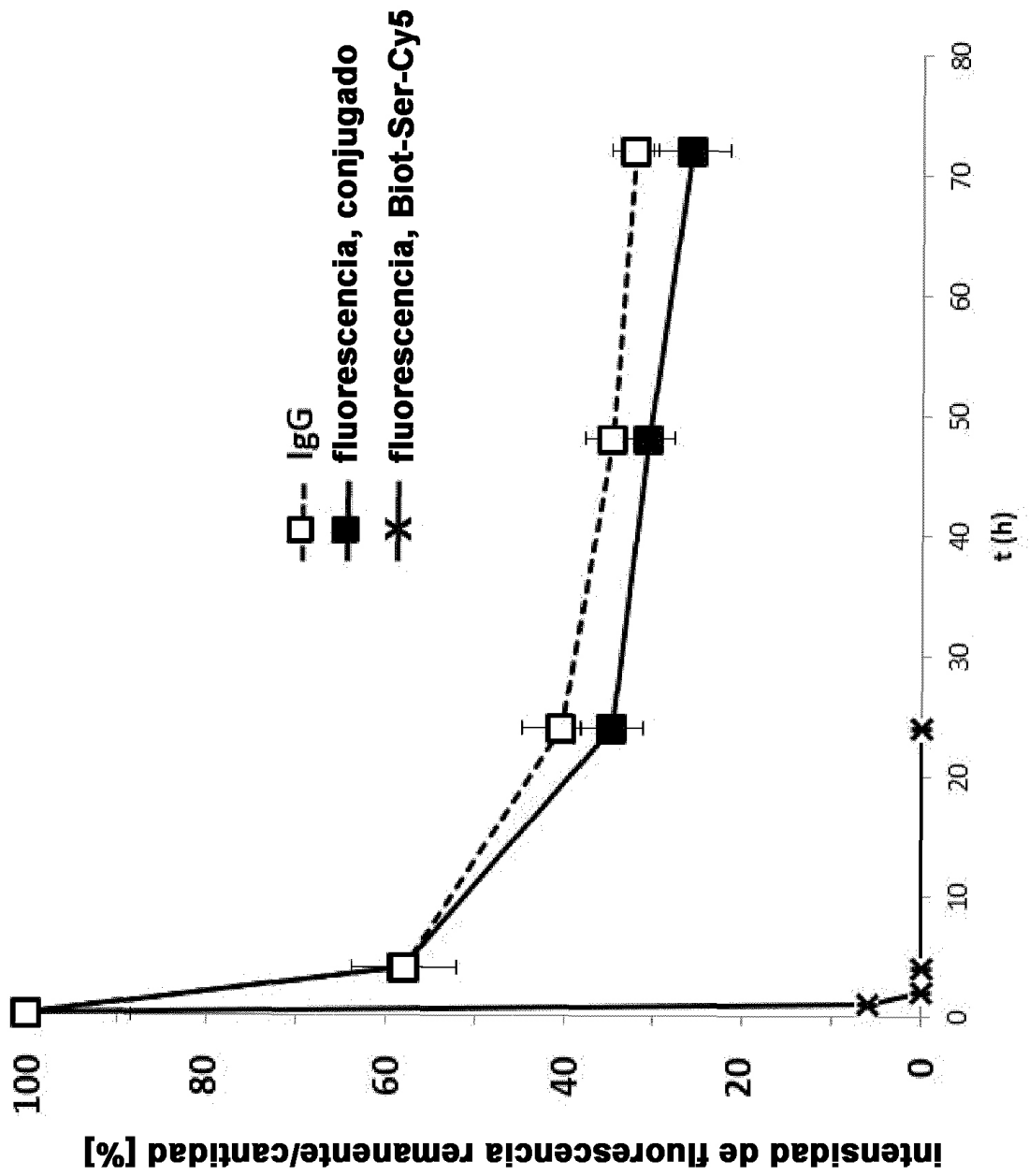
**Figura 33**



**Figura 34A**

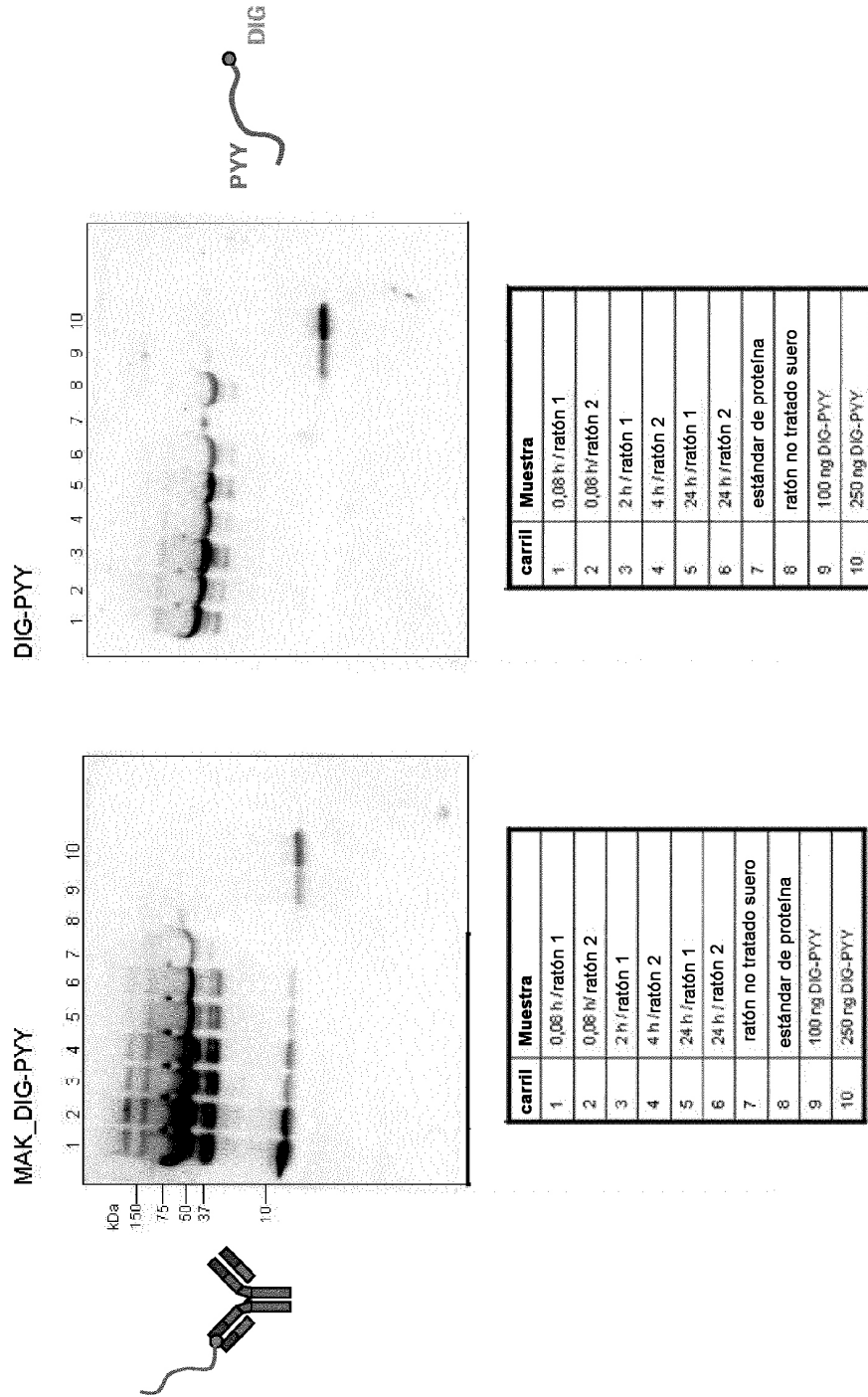


**Figura 34B**



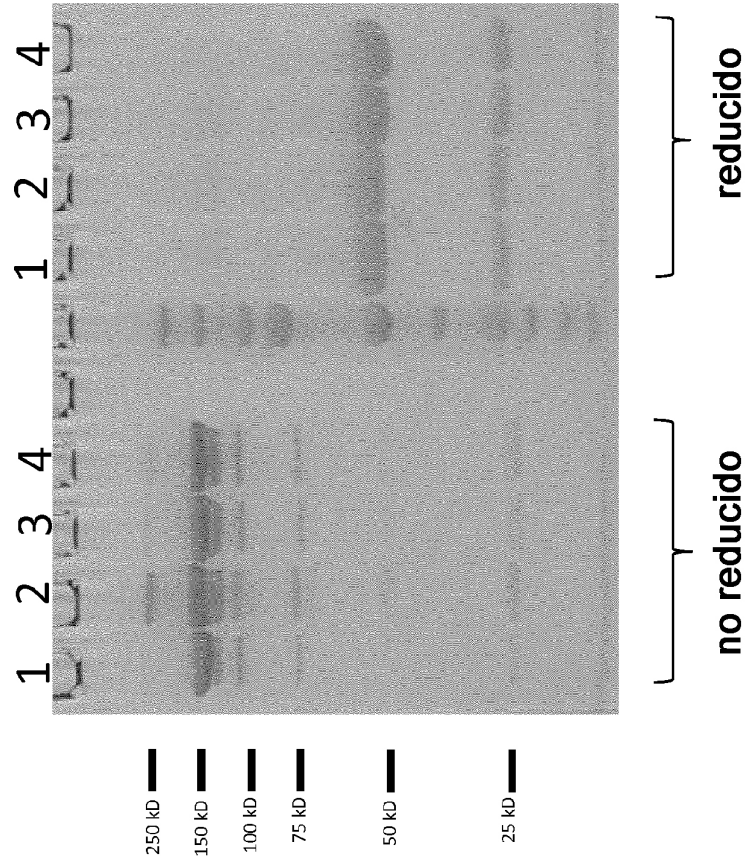


**Figura 35**

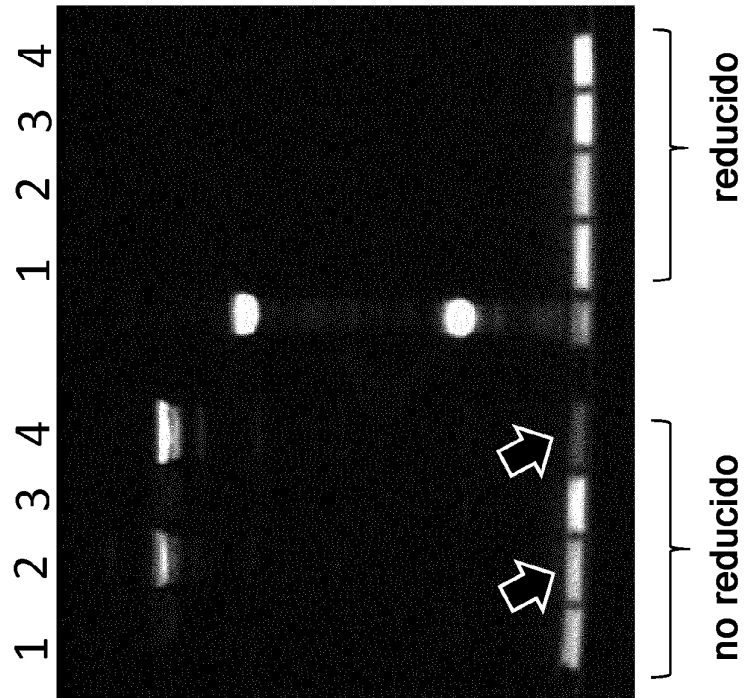


**Figura 36**

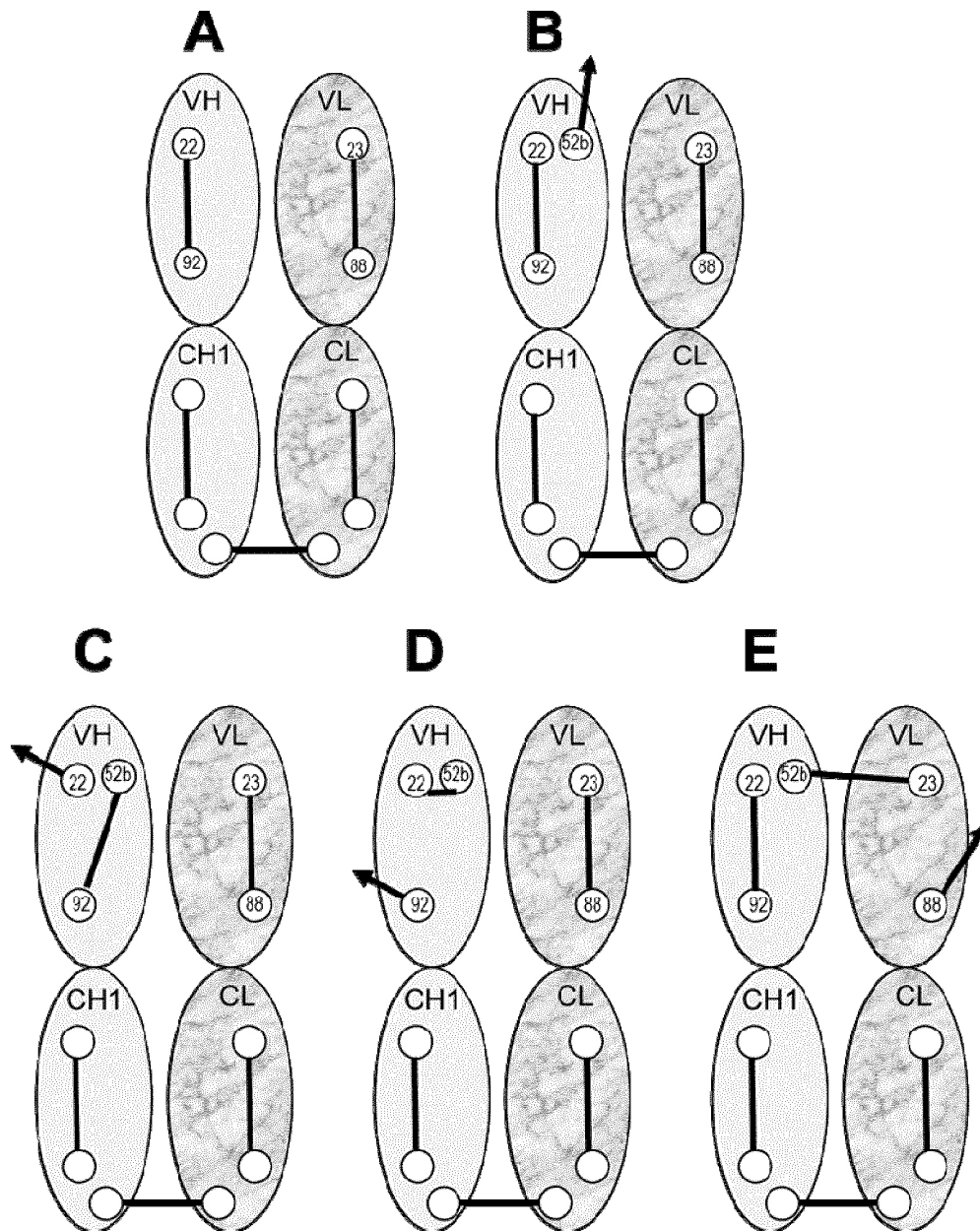
**Tinción de Coomassie**



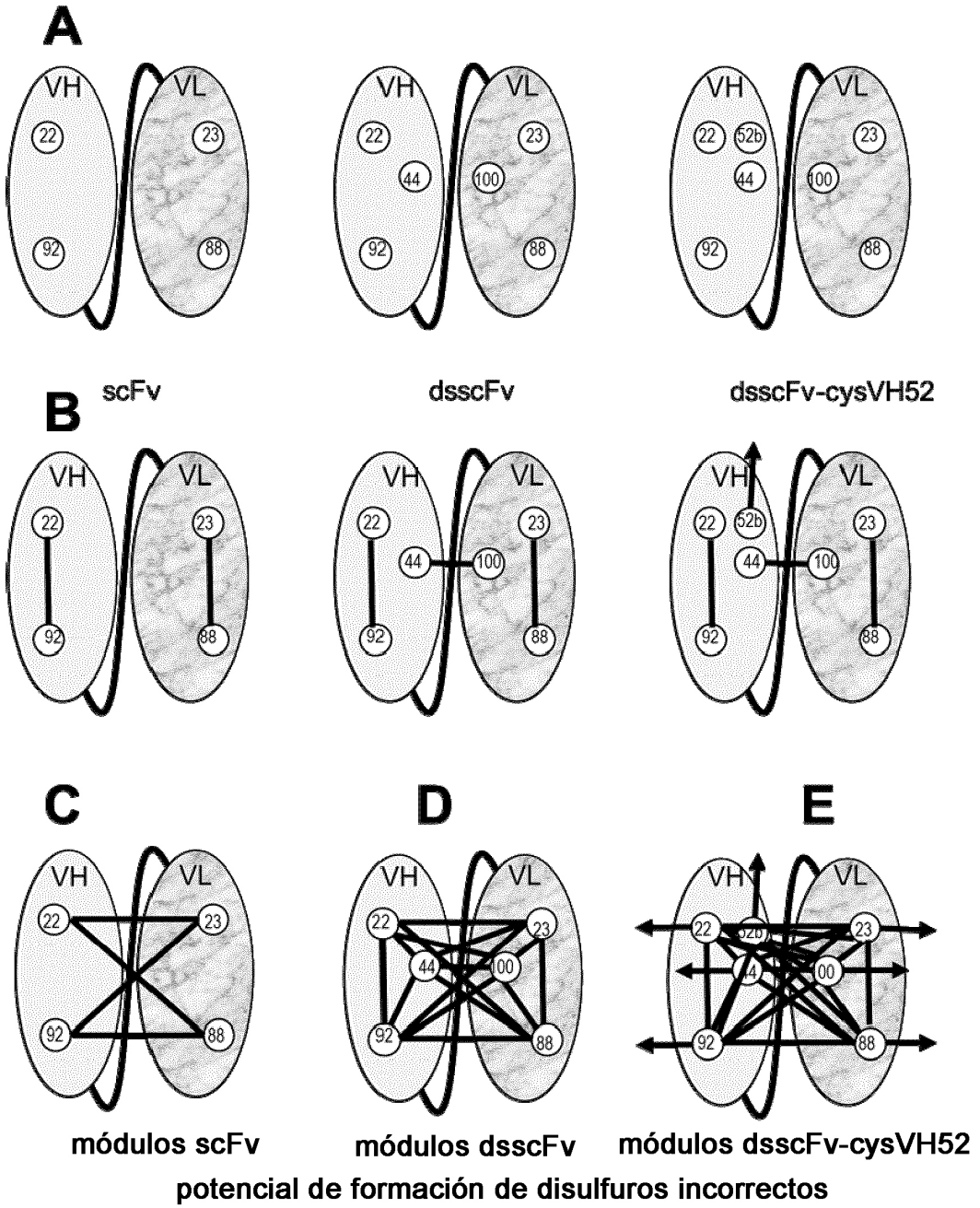
**Escaneo de fluorescencia**



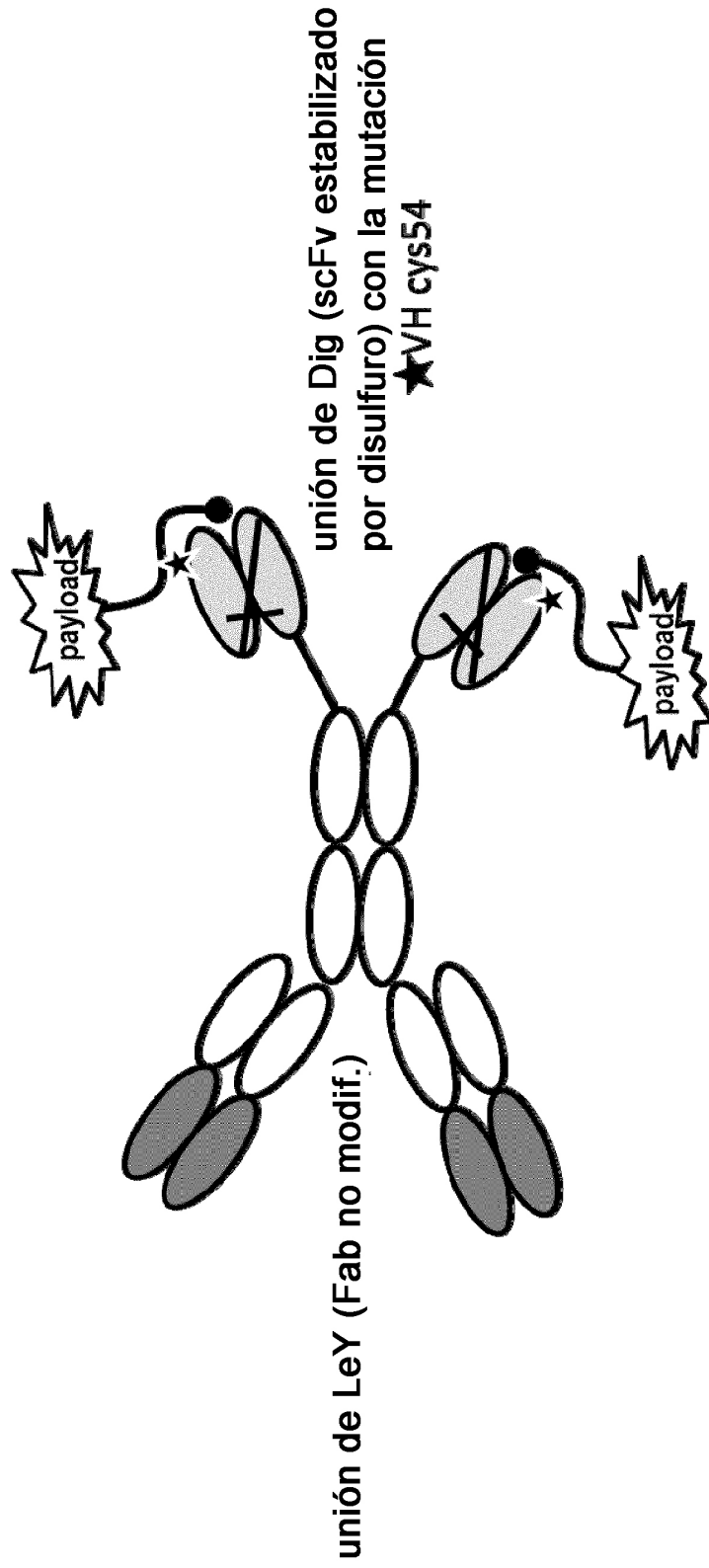
**Figura 37**



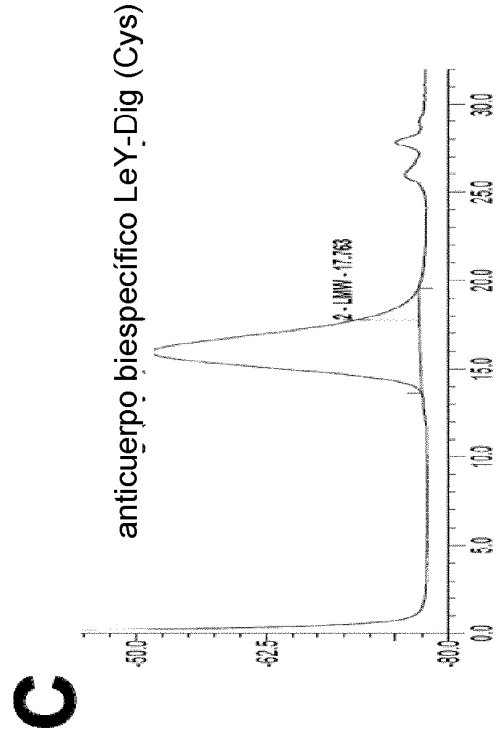
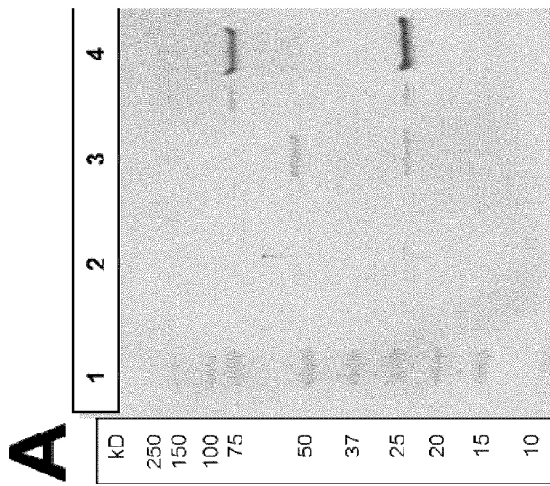
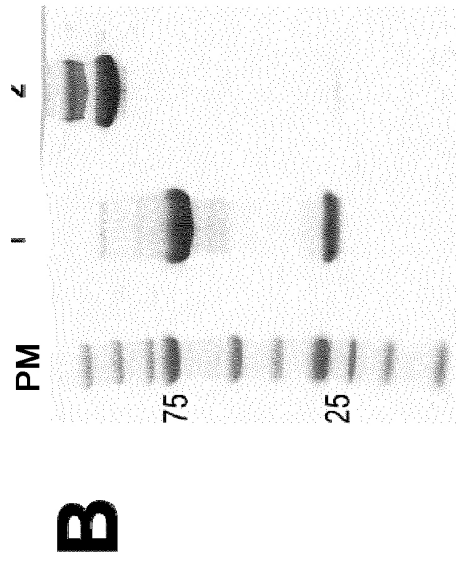
**Figura 38**



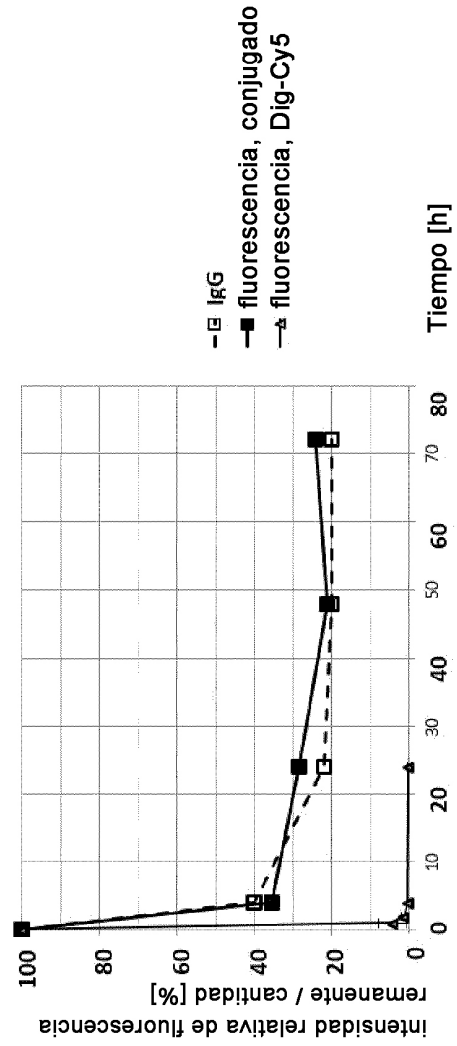
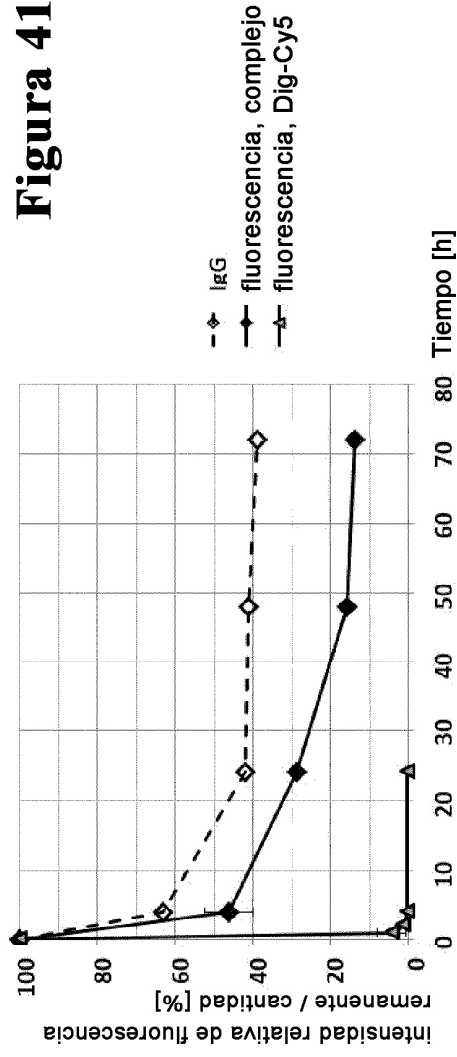
**Figura 39**



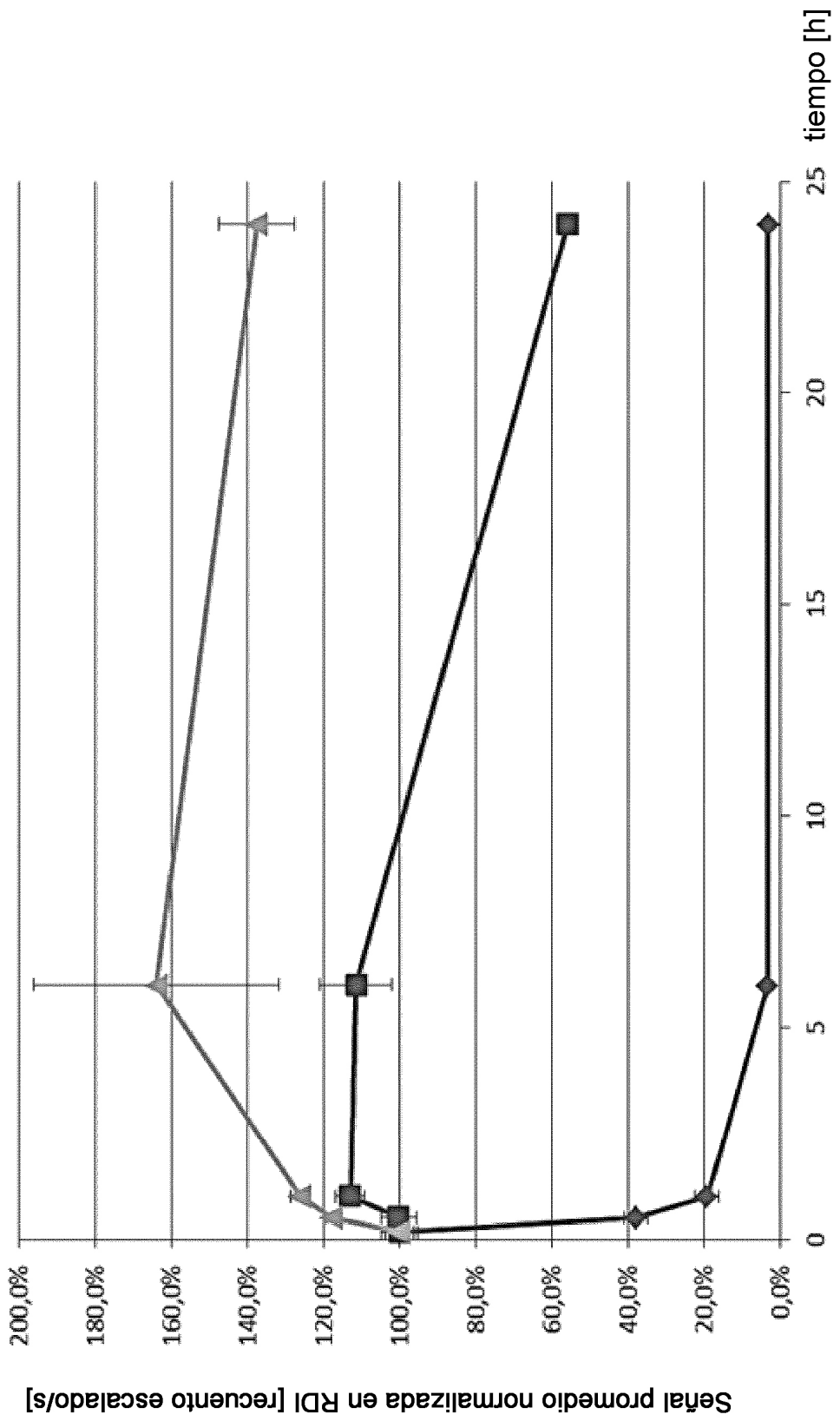
**Figura 40**



**Figura 41**

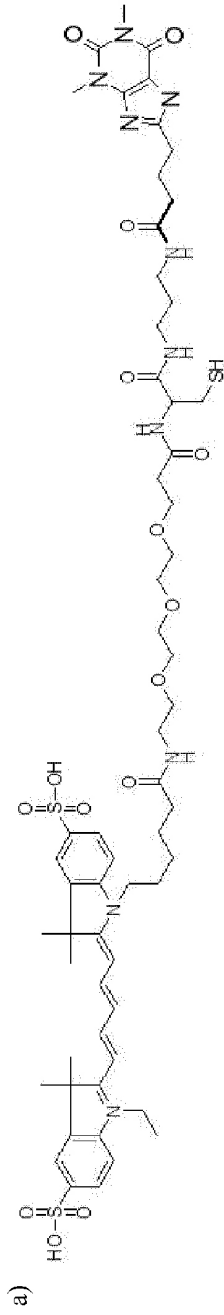


**Figura 42**

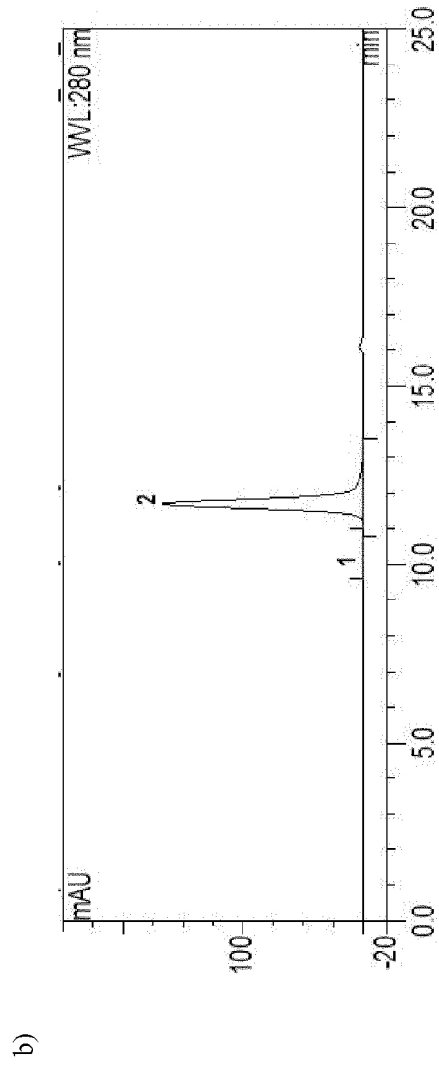




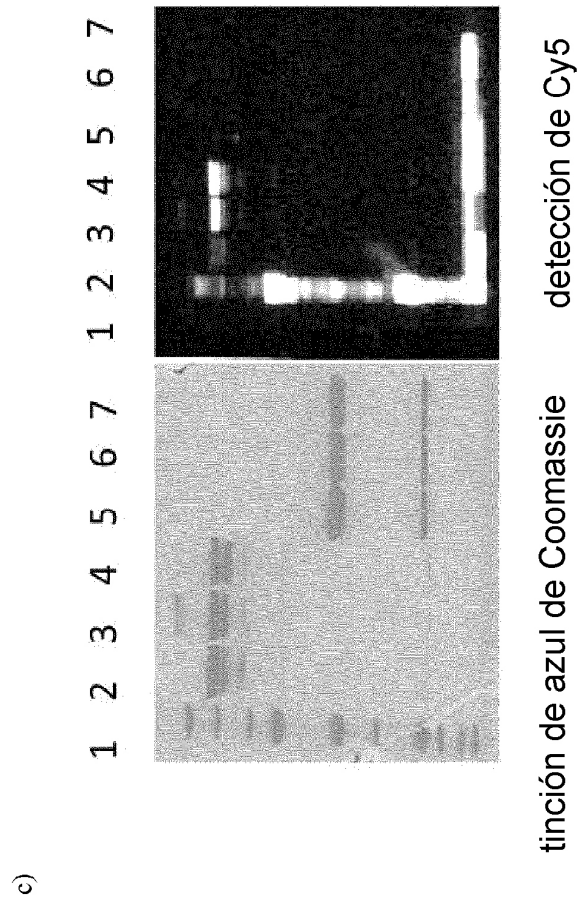
**Figura 43**



Peso de la fórmula : 1269,55(5)  
 Fórmula : C<sub>59</sub>H<sub>84</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>S<sub>3</sub>



**Figura 43 (continuación)**



**Figura 44**

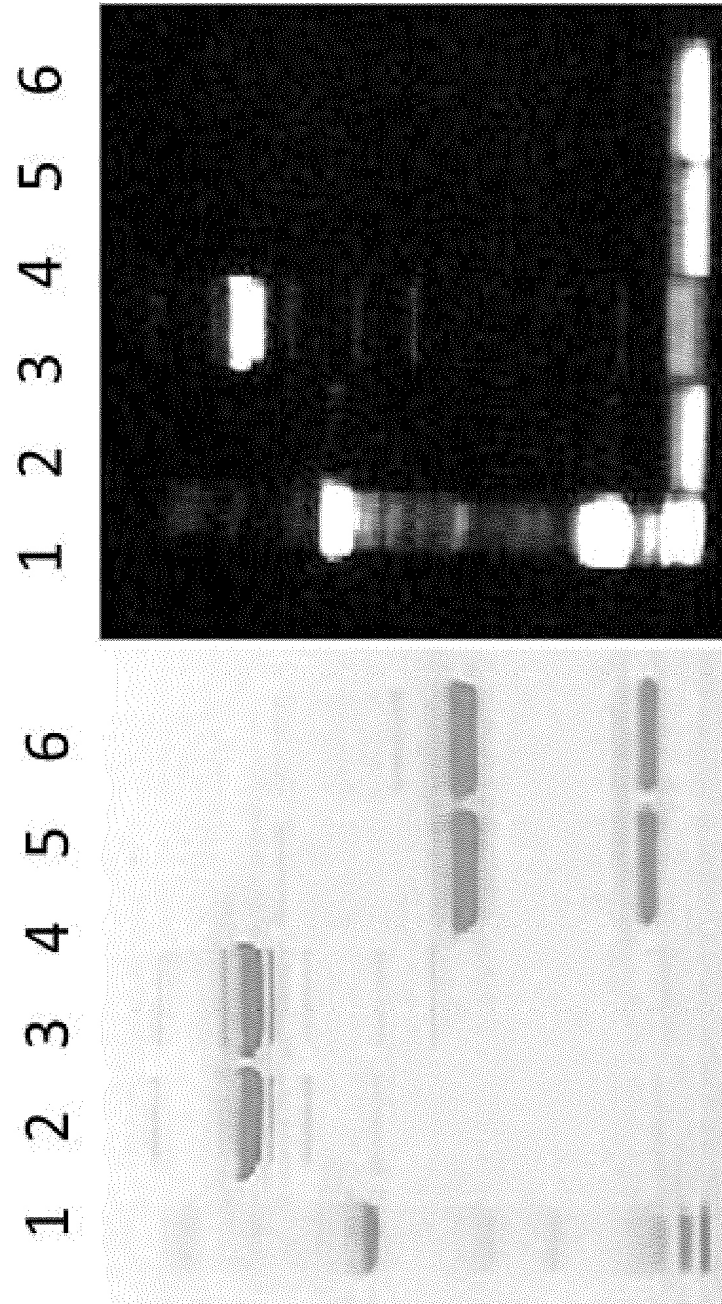
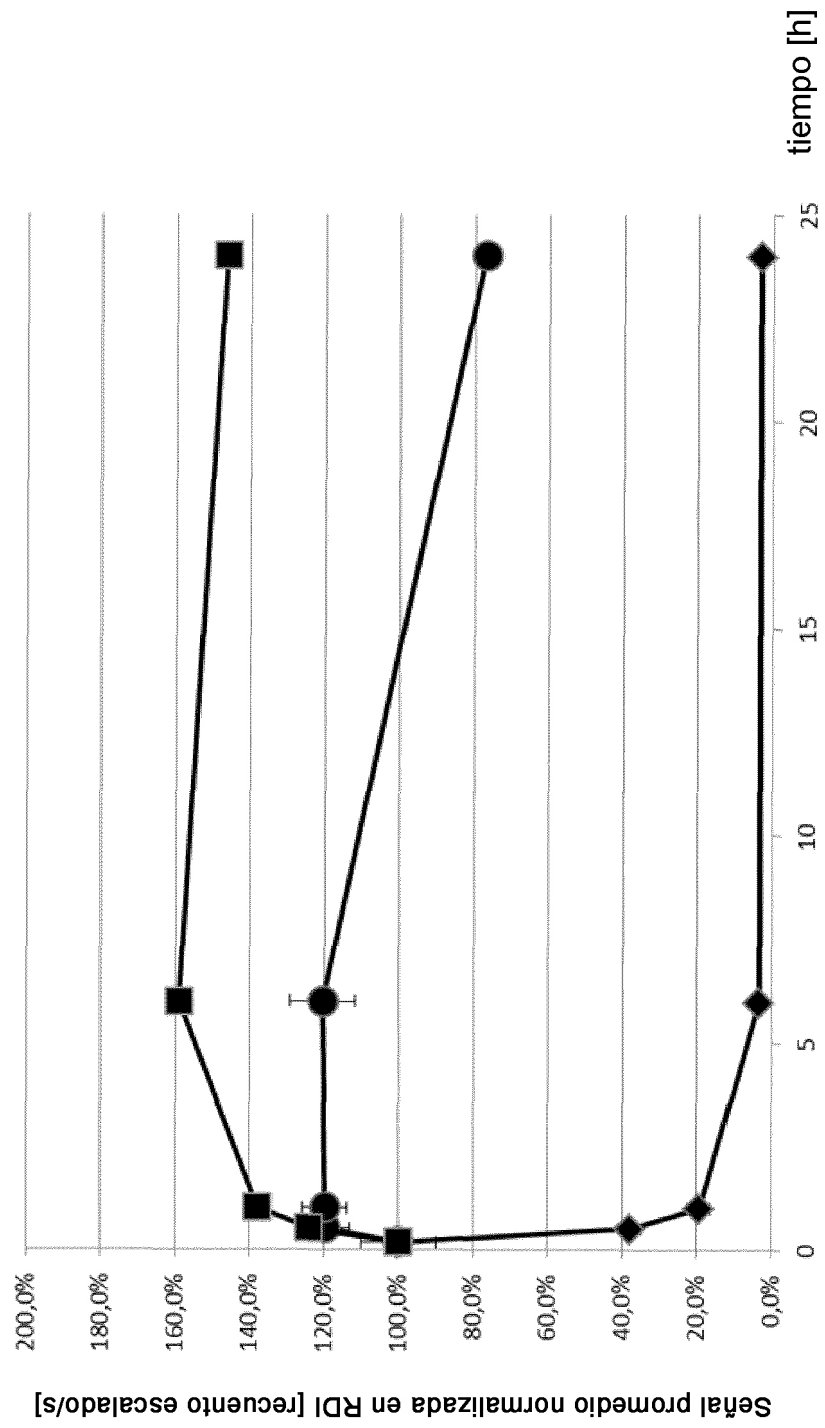


Figura 45



**Figura 46**

