

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 493**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/EP2011/073560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11808627 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2659269**

54 Título: **Detección de un polipéptido modificado post-traduccionalmente mediante un agente ligante bivalente**

30 Prioridad:

23.12.2010 EP 10196687

13.07.2011 EP 11173832

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

14.03.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

GERG, MICHAEL;

HEINDL, DIETER;

KLEIN, CHRISTIAN;

MERTENS, ALFRED;

SCHMID, VOLKER;

SCHRAEML, MICHAEL;

SOUKUPOVA, MONIKA y

TACKE, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 605 493 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de un polipéptido modificado post-traduccionamente mediante un agente ligante bivalente

5 Antecedentes de la invención

El presente documento se refiere a un agente ligante bivalente que consiste de un primer ligante monovalente que se une a un epítipo polipeptídico de un polipéptido diana, un segundo ligante monovalente que se une a una modificación polipeptídica post-traducciona sobre el polipéptido diana y un ligante. Se da a conocer además un método para la detección de un polipéptido diana modificado post-traduccionamente mediante la ayuda de dicho agente ligante bivalente, un método para preparar dicho agente ligante bivalente y la utilización de dicho agente bivalente en procedimientos de tinción histológica.

La estructura primaria de un polipéptido, es decir, su secuencia, está determinada por el ácido nucleico codificante del mismo. Sin embargo, el conocimiento de la estructura primaria de un polipéptido es sólo parte de la historia. Muchos polipéptidos, las estimaciones están comprendidas entre 50% y 90%, experimentan modificaciones secundarias. Dependiendo de, por ejemplo, el tipo de modificación secundaria, el porcentaje de polipéptidos modificados y/o, por ejemplo, la posición/localización exacta de una modificación secundaria, un polipéptido con la misma estructura primaria puede asumir funciones biológicas bastante diferentes.

Las modificaciones secundarias de la proteína realizan un ajuste fino de las funciones celulares de cada proteína. La comprensión de la relación entre las modificaciones post-traduccionales y los cambios funcionales ("post-traductómica") es un enorme esfuerzo realizado en todo el mundo, similar al del proyecto genoma humano. La proteómica, en combinación con la tecnología de separación y la espectrometría de masas, posibilita la disección y caracterización de las partes individuales de las modificaciones post-traduccionales y proporciona un análisis sistémico.

Aunque hace algunas décadas se creía que una proteína era un polímero lineal de aminoácidos, pronto se puso de manifiesto que dicha cadena polipeptídica podía presentar modificaciones simples de los aminoácidos. Sin embargo, recientemente se han descubierto modificaciones muy complejas en una proteína dentro de muchos procesos. Se ha observado una diversidad de modificaciones químicas en una sola proteína y estas modificaciones, solas o en diversas modificaciones, se producen de manera dependiente del tiempo y de señales. Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas determinan sus estructuras terciaria y cuaternaria y regulan sus actividades y funciones. El avance en la "post-traductómica" ha conducido a muchos avances revolucionarios en el conocimiento de las interacciones entre modificaciones secundarias y funciones biológicas, por ejemplo en relación a la regulación de las rutas bioquímicas y a estados de enfermedad en los que participan dichas proteínas.

Sin embargo, la detección y cuantificación de un polipéptido modificado secundariamente requiere sofisticadas herramientas y técnicas.

Con frecuencia se combinan diversos tipos de técnicas separativas y opcionalmente de fragmentación, con la espectroscopía de masas, con el fin de identificar un polipéptido modificado post-traduccionamente.

La detección inmunológica de un polipéptido modificado post-traduccionamente de manera consistente ha resultado ser complicada. Se han encontrado diversos tipos de problema. Puede resultar difícil obtener un inmunógeno necesario con suficientes pureza y cantidad. Los anticuerpos obtenidos según métodos estándares de inmunización y cribado podrían no presentar la especificidad y/o afinidad requeridos. Especialmente en el caso de que exista una necesidad de anticuerpo de calidad consistente y altamente reproducible, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, puede resultar muy complicado obtener dicho anticuerpo. Dicho anticuerpo debería unirse fuertemente a un epítipo consistente en la modificación secundaria y partes del polipéptido que lo porta. Sin embargo, muchos agentes ligantes generados mediante procedimientos rutinarios muestran reacciones cruzadas con otros polipéptidos con el mismo tipo de modificación post-traducciona, no muestran la afinidad requerida para el epítipo reconocido y/o muestran reactividad cruzada con el polipéptido no modificado.

Muchos de los polipéptidos de mayor tamaño incluso comprenden varios sitios para que se produzca un tipo de modificación post-traducciona. Pueden encontrarse presentes de modo estadístico, por ejemplo, varios residuos de treonina que están glucosilados. La evaluación del estado de glucosilación de dicho polipéptido podría requerir varios anticuerpos diferentes con especificidad para cada una de las posiciones que portan potencialmente la modificación post-traducciona.

A partir del comentario no exhaustivo anteriormente proporcionado de algunos posibles problemas de los procedimientos y agentes ligantes del estado de la técnica, resulta evidente que existe una urgente necesidad de proporcionar un agente ligante que se una a un polipéptido modificado post-traduccionamente de alta afinidad, que pueda producirse reproduciblemente en cantidad virtualmente ilimitada y con una calidad no comprometida.

Jarvis M. et al. ("In situ detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor beta using a generalized

proximity ligation method", Mol. Cell. Proteomics 6:1500-1509, 2007) informan de la detección *in situ* de una proteína diana fosforilada utilizando un método de ligación en proximidad. Williams B.A.R. et al. (J. Am. Chem. Soc. 131:17233-17241, 2009) dan a conocer reactivos de afinidad de proteínas mediante la combinación de ligantes peptídicos sobre andamiajes de ADN sintéticos. Machida S. et al. (Chemistry 14:1392-1401, 2008) informan de inhibidores bivalentes de geraniltransferasa de tipo I (GGTasa I) de mamífero basados en el ensamblaje de módulos para el reconocimiento simultáneo de superficies de proteína tanto interiores como exteriores. El documento nº EP1184665A1 da a conocer un anticuerpo que presenta reactividad con un péptido diana fosforilado.

Inesperadamente se ha encontrado puede detectarse un polipéptido diana modificado post-traduccionamente con un agente ligante bivalente que consiste de dos ligantes monovalentes que se unen entre sí mediante un conector, en el que el primer ligante monovalente se une a un epítipo polipeptídico de dicho polipéptido diana, el segundo ligante monovalente se une a una modificación polipeptídica post-traducciona, en el que cada ligante monovalente presenta una K_{dis} en el intervalo de entre 5×10^{-3} s y 10^{-4} /s, y en el que el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de 3×10^{-5} /s o inferior.

Descripción resumida de la invención

Las modificaciones polipeptídicas post-traduccionales resultan cruciales para modular y/o regular las propiedades y/o actividad de un polipéptido. Un método ventajoso para la utilización en la detección de un determinado tipo de modificación secundario en un polipéptido diana sería mediante un agente ligante específico.

Un primer aspecto de la presente invención es un agente ligante bivalente aislado de fórmula I:



capaz de unión a un polipéptido diana post-traduccionamente fosforilado, comprendiendo el agente ligante bivalente exactamente dos ligantes monovalentes A y B de diferente especificidad que se unen entre sí mediante un conector, en el que:

- a) - representa un enlace covalente,
- b) a-S-b es el conector, con una longitud de entre 10 nm y 50 nm, en el que S es un espaciador,
- c) a':a y b:b' son parejas de unión que consisten de secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, formando cada una un dúplex estable mediante apareamiento de múltiples bases, en el que las secuencias de la pareja de unión a':a no se unen a la secuencias de la pareja de unión b:b', respectivamente, y viceversa.
- d) el primer ligante monovalente A es una molécula que interactúa con el polipéptido diana en un único sitio de unión, en el que el primer ligante monovalente se unen a un epítipo de dicho polipéptido diana y en el que el epítipo del polipéptido no es sometido a una modificación post-traducciona,
- e) el segundo ligante monovalente B se une a una fosforilación post-traducciona, en el que la K_{dis} del segundo ligante monovalente es por lo menos 20 veces inferior para un polipéptido que porta la fosforilación post-traducciona que en el mismo polipéptido no fosforilado post-traduccionamente,
- f) cada ligante monovalente se selecciona de entre el grupo que consiste de un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal,
- g) cada ligante monovalente presenta una K_{dis} comprendida en el intervalo de entre 5×10^{-3} /s y 10^{-4} /s, determinada mediante espectroscopía de resonancia del plasmón superficial basada en un biosensor, y
- h) el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de 3×10^{-5} /s o inferior, determinada mediante espectroscopía de resonancia del plasmón superficial basada en un biosensor.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método de tinción histológica, comprendiendo el método las etapas siguientes:

- a) proporcionar una muestra de células o de tejido,
- b) incubar dicha muestra con un agente ligante bivalente según la invención, y
- c) detectar el agente ligante bivalente, tiñendo de esta manera dicha muestra para un polipéptido diana fosforilado post-traduccionamente.

Además, el presente documento se refiere a un agente ligante bivalente que se une a un polipéptido diana modificado post-traduccionamente que consiste de dos ligantes monovalentes que se encuentran unidos entre sí mediante un conector, en el que el primer ligante monovalente se une a un epítipo de dicho polipéptido diana, en el que el segundo ligante monovalente se une a una modificación post-traducciona del polipéptido, en el que cada ligante monovalente presenta una K_{dis} comprendida en el intervalo de entre 5×10^{-3} /s y 10^{-4} /s, y en el que el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de 3×10^{-5} /s o inferior.

Se da a conocer además un método para obtener un agente ligante bivalente que se une específicamente a un polipéptido diana modificado post-traduccionamente, comprendiendo el método las etapas de seleccionar un primer ligante monovalente que se une a un epítipo modificado no post-traduccionamente de dicho polipéptido diana con una K_{dis} de entre 5×10^{-3} /s y 10^{-4} /s, seleccionar un segundo ligante monovalente que se une a una modificación

polipeptídica post-traducciona con una K_{dis} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, acoplar ambos ligantes monovalentes con un conector y seleccionar un agente ligante bivalente que presenta un valor de K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior.

5 La utilización del nuevo agente ligante bivalente según la invención, especialmente en un procedimiento inmunohistoquímico, también se describe y se reivindica.

Descripción detallada de la invención

10 El presente documento se refiere a un agente ligante bivalente que se une a un polipéptido diana modificado post-traducciona que consiste de dos ligantes monovalentes que se encuentran unidos entre sí mediante un conector, en el que: a) el primer ligante monovalente se une a un epítipo de dicho polipéptido diana, b) el segundo ligante monovalente se une a una modificación post-traducciona del polipéptido, c) cada ligante monovalente presenta una K_{dis} comprendida en el intervalo de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, y d) el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior.

15 La presente invención proporciona un agente ligante bivalente aislado de fórmula I:



20 capaz de unión a un polipéptido diana post-traducciona fosforilado, comprendiendo el agente ligante bivalente exactamente dos ligantes monovalentes A y B de diferente especificidad que se unen entre sí mediante un conector, en el que:

- 25 a) - representa un enlace covalente,
 b) a-S-b es el conector, con una longitud de entre 10 nm y 50 nm, en el que S es un espaciador,
 c) a':a y b:b' son parejas de unión que consisten de secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, formando cada una un dúplex estable mediante apareamiento de múltiples bases, en el que las secuencias de la pareja de unión a':a no se unen a la secuencias de la pareja de unión b:b', respectivamente, y viceversa.
 30 d) el primer ligante monovalente A es una molécula que interactúa con el polipéptido diana en un único sitio de unión, en el que el primer ligante monovalente se unen a un epítipo de dicho polipéptido diana y en el que el epítipo del polipéptido no es sometido a una modificación post-traducciona,
 e) el segundo ligante monovalente B se une a una fosforilación post-traducciona, en el que la K_{dis} del segundo ligante monovalente es por lo menos 20 veces inferior para un polipéptido que porta la fosforilación post-traducciona que en el mismo polipéptido no fosforilado post-traducciona,
 35 f) cada ligante monovalente se selecciona de entre el grupo que consiste de un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal,
 g) cada ligante monovalente presenta una K_{dis} comprendida en el intervalo de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, determinada mediante espectroscopía de resonancia del plasmón superficial basada en un biosensor, y
 40 h) el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior, determinada mediante espectroscopía de resonancia del plasmón superficial basada en un biosensor.

El agente ligante bivalente según la presente invención es un agente ligante que comprende exactamente dos ligantes monovalentes de especificidad diferente.

45 En una realización, las propiedades de tasa cinética de cada ligante monovalente y del agente ligante bivalente se caracterizan mediante tecnología de RPS Biacore™, tal como se indica en detalle en los ejemplos.

Tal como apreciará el experto en la materia, el agente ligante bivalente indicado en la presente invención puede aislarse y purificarse tal como se desee. En un aspecto, la presente invención se refiere a un agente ligante bivalente aislado tal como se da a conocer en la presente memoria. Un agente ligante bivalente "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de, por ejemplo, la mezcla de reactivos utilizada en la síntesis de dicho agente ligante bivalente. Son componentes no deseados de dicha mezcla de reacción, por ejemplo, ligantes monovalentes que no han terminado en el agente ligante bivalente deseado. En una realización, el agente ligante bivalente se purifica hasta un nivel superior al 80%. En algunas realizaciones, el agente ligante bivalente se purifica hasta un nivel superior al 90%, al 95%, al 98% o al 99% en peso, respectivamente. En el caso de que ambos ligantes monovalentes sean polipéptidos, la pureza se determina fácilmente mediante, por ejemplo, SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras, utilizando, por ejemplo, tinción de azul de Coomassie o de plata en la detección de la proteína. En el caso de que la pureza se evalúe al nivel de ácidos nucleicos, se aplica la cromatografía de exclusión por tamaño a la separación del agente ligante bivalente respecto de productos secundarios y se monitoriza la DO a 260 nm para evaluar su pureza.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un anticuerpo" se refiere a un anticuerpo o a más de un anticuerpo.

65 El término "oligonucleótido" o "secuencia de ácidos nucleicos", tal como se utilizan en la presente memoria,

generalmente se refieren a polinucleótidos cortos generalmente de cadena sencilla que comprenden por lo menos 8 nucleótidos y como máximo aproximadamente 1.000 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ó 30 nucleótidos. En una realización preferente, un oligonucleótido presenta una longitud de por lo menos 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 ó 30 nucleótidos. La descripción proporcionada posteriormente para los polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a los oligonucleótidos.

El término oligonucleótido debe entenderse ampliamente e incluye ADN y ARN así como análogos y modificaciones de los mismos.

Un oligonucleótido puede contener, por ejemplo, un nucleótido sustituido que porta un sustituyente en las bases estándares desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG), desoxicitosina (dC), desoxitimidina (dT) y desoxiuracilo (dU). Son ejemplos de dichas nucleobases sustituidas: pirimidinas 5-sustituidas, tales como 5-metil-dC, aminoalil-dU o dC, 5-(aminoetil-3-acrilimido)-dU, 5-propinil-dU o -dC, 5-dU o -dC halogenado; pirimidinas N-sustituidas, tales como N4-etil-dC; purinas N-sustituidas, tales como N6-etil-dA, N2-etil-dG; purinas sustituidas en 8, tales como 8-[(6-amino)-hex-1-il]-8-amino-dG o -dA, dA o dG halogenado en 8, 8-alkil dG o dA y dA sustituido en 2, tal como 2-amino-dA.

Un oligonucleótido puede contener un nucleótido o un análogo de nucleósido, es decir, las nucleobases naturales pueden intercambiarse mediante la utilización de análogos de nucleobase como 5-nitroindol D-ribosa, 3-nitropirrol D-ribosa, desoxiinosina (dI), desoxixantosa (dX), 7-deaza-dG, -dA, -dI o -dX, 7-deaza-8-aza-dG, -dA, -dI o -dX, 8-aza-dA, -dG, -dI o -dX, d-formicina, pseudo-dU, pseudo-iso-dC, 4-tio-dT, 6-tio-dG, 2-tio-dT, iso-dG, 5-metil-iso-dC, 8-aza-7-deaza-dA unido en N8, 5,6-dihidro-5-aza-dC y eteno-dA o pirrolo-dC. Tal como resultará evidente para el experto en la materia, la nucleobases en la cadena complementaria debe seleccionarse de manera que la formación del dúplex sea específica. En el caso de que, por ejemplo se utilice 5-metil-iso-dC en una cadena (por ejemplo (a)), iso-dG debe encontrarse presente en la cadena complementaria (por ejemplo (a')).

El esqueleto oligonucleótido puede modificarse para contener residuos sacáridos sustituidos, análogos de azúcar, modificaciones en la fracción fosfato internucleósido y/o ser un APN.

Un oligonucleótido puede contener, por ejemplo, un nucleótido con una desoxirribosa sustituida como 2'-metoxi, 2'-fluoro, 2'-metilseleno, 2'-aliloxi, 4'-metil-dN (en el que N es una nucleobase, por ejemplo A, G, C, T o U).

Son análogos de azúcar, por ejemplo, xilosa, ribosa puenteada en 2',4', tal como (2'-O,4'-C-metileno)-(oligómero conocido como ALN) o (2'-O, 4'-C-etileno)-(oligómero conocido como ANE); L-ribosa, L-D-ribosa, hexitol (oligómero conocido como ANH); ciclohexenilo (oligómero conocido como ANCe), altritol (oligómero conocido como ANA); un análogo de ribosa tricíclico en el que los átomos C3' y C5' se encuentran conectados mediante un puente etileno que se encuentra fusionado con un anillo ciclopropano (oligómero conocido como tricicloADN), glicerina (oligómero conocido como ANG), glucopiranosita (oligómero conocido como homo-ADN), carbarribosa (con un ciclopentano en lugar de una subunidad tetrahidrofurano), hidroximetil-morfolina (oligómero conocido como morfolino-ADN).

Un gran número de modificaciones de la fracción fosfato internucleosídica también es conocido que no interfiere con las propiedades de hibridación y dichas modificaciones del esqueleto también pueden combinarse con nucleótidos sustituidos o análogos de nucleótido. Son ejemplos los oligonucleótidos fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato y metilfosfonato.

El APN (que presenta un esqueleto sin fosfato ni D-ribosa) también puede utilizarse como un análogo de ADN.

Los nucleótidos modificados y análogos de nucleótidos anteriormente indicados, así como las modificaciones del esqueleto oligonucleótido pueden combinarse como se desee en un oligonucleótido en el sentido de la presente invención.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan intercambiamente. Un polipéptido en el sentido de la presente invención consiste de por lo menos 5 aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos alfa-amino.

Un "polipéptido diana" es un polipéptido de interés para el que se busca un método de determinación o medición. El polipéptido diana de la presente invención es un polipéptido que es conocido o que se sospecha que porta una modificación post-traducciona del polipéptido.

Un "ligante monovalente" según la presente invención es una molécula seleccionada de entre el grupo que consiste de un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal, interactuando dicha molécula con el polipéptido diana en un único sitio de unión con una K_{dis} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$. La caracterización biofísica de las propiedades cinéticas de tasa de unión, la terminación de la constante de tasa de disociación $k_d(1/s)$ según el modelo de Langmuir se analizaron mediante espectroscopía de resonancia del plasmón superficial basada en un biosensor. Preferentemente se utiliza la tecnología Biacore™, tal como se indica en detalle en la sección de Ejemplos.

Son ejemplos de ligantes monovalentes dados a conocer adicionalmente, péptidos, miméticos de péptido, aptámeros, spiegelmeros, darpinas, lectinas, proteínas de repetición de anquirina y dominios de tipo Kunitz. Según la invención, entre los ligantes monovalentes se incluyen específicamente los anticuerpos de dominio único (ver Hey T. et al., Trends Biotechnol. 23:514-522, 2005) y fragmentos monovalentes de anticuerpos.

En determinadas realizaciones preferentes, el ligante monovalente es un fragmento de anticuerpo monovalente, preferentemente un fragmento monovalente derivado de un anticuerpo monoclonal.

Entre los fragmentos de anticuerpo monovalentes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los fragmentos Fab, Fab'-SH (Fab'), anticuerpo de dominio único y fragmentos scFv, tal como se proporciona posteriormente. Se dan a conocer además fragmentos Fv.

En una realización preferente, por lo menos uno de los ligantes monovalentes es un anticuerpo de dominio único, un fragmento Fab o un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal.

También representa una realización preferente que en el agente ligante bivalente dado a conocer en la presente memoria, los ligantes monovalentes se derivan de anticuerpos monoclonales y son fragmentos Fab, o fragmentos Fab' o un fragmento Fab y un fragmento Fab'.

Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes ligantes extremadamente específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos o fragmentos de los mismos. Son particularmente bien conocidas de la técnica, técnicas para crear anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, mediante la inmunización de ratones, conejos, hámsters o cualquier otro mamífero con un polipéptido de interés. Otro método para crear anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, es la utilización de bibliotecas fágicas de sFv (región variable de cadena sencilla), concretamente sFv humanas (ver, por ejemplo, Griffiths et al., patente US nº 5.885.793; McCafferty et al., documento nº WO 92/01047; Liming et al., documento nº WO 99/06587).

Pueden generarse fragmentos de anticuerpos por medios tradicionales, tales como la digestión enzimática o mediante técnicas recombinantes. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, ver Hudson P.J. et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003.

Un Fc es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo y que no presenta región constante. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En una realización de una especie de Fv de cadena sencilla (scFv), puede unirse covalentemente un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera mediante un conector peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura dimérica análoga a la presente en una especie Fv de dos cadenas. Para una revisión de scFv, ver, por ejemplo, Pluckthuen A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), Springer-Verlag, New York (1994), páginas 269 a 315; ver también la patente WO nº 93/16185, y las patentes US nº 5.571.894 y nº 5.587.458. Generalmente, seis regiones hipervariables (RHV) confieren especificidad de unión a antígeno a un anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres RHV específicas para un antígeno) presenta la capacidad de reconocer y unirse a antígeno.

Un fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas ligera y pesada y también contiene 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 cisteína portan un grupo tiol libre.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, dichos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117, 1992, y Brennan et al., Science 229:81-83, 1985). Por ejemplo, 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.

Los fragmentos de anticuerpo también pueden producirse directamente utilizando células huésped recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y ser secretados por *E. coli*, permitiendo de esta manera la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Pueden aislarse fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas fágicas de anticuerpos siguiendo procedimientos estándares. Alternativamente, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* (Carter P. et al., BioTechnology 10:163-167, 1992). También pueden utilizarse sistemas de células de mamífero para expresar y, si se desea, secretar fragmentos de anticuerpos.

En determinadas realizaciones, un ligante monovalente comprendido en el agente ligante bivalente de la presente invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una única cadena polipeptídica que comprende 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 nº 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste de la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo.

Uno de los dos ligantes monovalentes, el primer ligante monovalente, se une a un epítipo de polipéptido sobre el polipéptido diana.

Un "epítipo de polipéptido" según la presente invención, el sitio de unión en el polipéptido diana unido mediante el ligante monovalente correspondiente, está compuesto de aminoácidos. Dicho ligante se une a un epítipo lineal, es decir, un epítipo que consiste de un tramo de 5 a 12 aminoácidos consecutivos, o el ligante monovalente se une a una estructura terciaria formada mediante la disposición espacial de varios tramos cortos del polipéptido diana. Los epítipos terciarios reconocidos por un ligante, por ejemplo por el sitio de reconocimiento de antígeno o paratopo de un anticuerpo, pueden considerarse características superficiales tridimensionales de una molécula de antígeno; estas características encajan con precisión en el sitio de unión correspondiente del ligante y de esta manera la unión entre el ligante y el polipéptido diana resulta facilitado.

Mientras que en el agente ligante bivalente tal como se da a conocer en la presente memoria el primer ligante monovalente se une a un epítipo de polipéptido, el segundo ligante monovalente se une a una modificación post-traducciona de polipéptido, concretamente a una fosforilación post-traducciona, según la invención.

Una "modificación post-traducciona de polipéptido" es una modificación covalente de un aminoácido dentro de un polipéptido (proteína) o en el extremo del mismo. Las expresiones modificación secundaria y modificación post-traducciona son intercambiables.

Son conocidos muchos tipos de modificaciones de aminoácido co-valentes y han sido el objeto de artículos científicos de revisión. Las modificaciones post-traduccionales descritas en los artículos de revisión de Mann y Jensen, 2003, y de Seo y Lee, 2004, se encuentran incluidas en la presente memoria como referencia (Mann M. y Jensen O.N., Nat. Biotechnol. 21:255-261, 2003; Seo J. y Lee, K.-J., Biochem. Mol. Biol. 37/1:35-44, 2004).

En una realización preferente dada a conocer en la presente memoria, la modificación post-traducciona se selecciona de entre el grupo que consiste de acetilación, fosforilación, acilación, metilación, glucosilación, ubiquitinilación, sumoilación, sulfatación y nitración. Según la invención, la modificación post-traducciona es una fosforilación.

La acetilación (+42 Da) es una modificación secundaria bastante estable. Son ejemplos la acetilación que se encuentra en los extremos N-terminales de muchas proteínas o la acetilación en los residuos de lisina o de serina. Habitualmente la acetilación de un residuo de lisina se encuentra en una o más posiciones bien definidas dentro de una cadena polipeptídica, mientras que otros residuos de lisina se encuentran menos acetilados o no se encuentran acetilados en absoluto.

La fosforilación y la desfosforilación (el equilibrio neto de los cuales pueden denominarse estado de fosforilación) de una proteína es conocido que es uno de los elementos clave en la regulación de la actividad biológica de la proteína. Un porcentaje bajo de residuos aminoácidos fosforilados ya puede resultar suficiente para inducir una determinada actividad biológica. La fosforilación resulta en un incremento de la masa de 80 Da. Los aminoácidos tirosina (Y), serina (S), treonina (T), histidina (H) y ácido aspártico (D) pueden encontrarse fosforilados. Cuanto más compleja sea la función biológica de un polipéptido, más complejo es el patrón correspondiente de los posibles sitios de fosforilación. Lo anterior es especialmente conocido y cierto para receptores unidos a membrana, especialmente las denominadas receptor tirosina quinasas (RTQ). Tal como ya sugiere la nomenclatura, por lo menos parte de la señalización intracelular de las RTQ se encuentra mediada por el estado de fosforilación de determinadas tirosinas del dominio intracelular de dichas RTQ.

Los polipéptidos pueden ser acilados por grupos farnesilo, miristoilo o palmitoilo. La acilación habitualmente se produce en la cadena lateral de un residuo cisteína.

La metilación como modificación secundaria se produce mediante la cadena lateral de un residuo de lisina. Se ha demostrado que las propiedades de unión de las proteínas reguladoras que son capaces de unirse a un ácido nucleico pueden ser modulados, por ejemplo, mediante metilación.

La glucosilación es una modificación secundaria muy importante. Presenta una influencia grande sobre las interacciones de proteína-proteína, sobre la solubilización de las proteínas y la estabilidad de las mismas. Se conocen dos tipos diferentes de glucosilación: las cadenas laterales unidas mediante N (mediante el N de aminoácido (asparagina)) y las cadenas laterales unidas mediante O (mediante serina (S) o treonina (T)). Se han

identificado muchos polisacáridos diferentes (cadenas laterales lineales o ramificadas), algunos contienen derivados de azúcar como O-Glc-NAc.

5 La ubiquitinilación y la sumoilación, respectivamente, es conocido que influyen sobre la semivida de las proteínas en circulación. La ubiquitinilación puede servir como señal de destrucción, resultando en el corte y/o la eliminación de los polipéptidos ubiquitinilados.

10 La sulfatación mediante un residuo de tirosina (Y) aparentemente resulta importante en la modulación de la interacción proteína-proteína (célula-célula), así como en la interacción de ligandos de proteína.

15 La nitratación de los residuos de tirosina (Y) aparentemente es un rasgo distintivo del daño oxidativo, tal como en, por ejemplo, los procesos inflamatorios.

La modificación post-traduccional unida mediante el segundo ligante monovalente puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de acetilación, glucosilación y, según la invención, fosforilación.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, la fosforilación, la desfosforilación y el estado de fosforilación son claves para la regulación de la señalización celular y la actividad de las proteínas. Lo anterior es especialmente conocido y cierto para receptores unidos a membrana, especialmente las denominadas receptor tirosina quinasas (RTQ). Tal como ya sugiere la nomenclatura, por lo menos parte de la señalización intracelular de las RTQ se encuentra mediada por el estado de fosforilación de determinadas tirosinas del dominio intracelular de dichas RTQ. En un aspecto, la presente invención se refiere de esta manera a un agente ligante bivalente que se une a una proteína diana fosforilada. Evidentemente dicho agente ligante bivalente resulta de gran utilidad en la detección de un polipéptido diana fosforilado.

25 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un agente ligante bivalente tal como se da a conocer en la presente memoria anteriormente, en el que el polipéptido diana se selecciona de entre el grupo que consiste de moléculas de receptor unidas a membrana que presentan un sitio de fosforilación intracelular y moléculas de señalización celular intracelulares. En dicho agente ligante bivalente, el primer ligante monovalente, que se une a un epítipo de polipéptido sobre la proteína diana, unirá específicamente dicha molécula de receptor o dicha molécula de señalización celular intracelular, mientras que el segundo ligante monovalente que dirige la fosforilación no necesita unirse específicamente a un sitio de fosforilación en dicha proteína diana. La reactividad cruzada con un sitio de fosforilación sobre, por ejemplo, un receptor relacionado, no altera la detección específica del polipéptido diana debido a que la unión significativa requiere ambos, la unión del primero y la unión del segundo ligante monovalente.

30 En algunas realizaciones, la RTQ se selecciona de entre el grupo que consiste de: ALK, receptor quinasa relacionada con la adhesión (por ejemplo, Axl), receptores de ERBB (por ejemplo, RFCE, ERBB2, ERBB3, ERBB4), receptores hepatocelulares productores de eritropoyetina (EPH) (por ejemplo, EphA1; EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB5, EphB6), receptores de factor de crecimiento fibroblástico (FCF) (por ejemplo RFCF1, RFCF2, RFCF3, RFCF4, RFCF5), Fgr, IGFIR, Insulina R, LTK, M-CSFR, MUSK, receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP PDGF) (por ejemplo RFCDP-A, RFCDP-B), RET, ROR1, ROR2, ROS, RYK, receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) (por ejemplo RFCEV1/FLT1, RFCEV2/FLK1, RFCEV3), tirosina quinasa con dominios de tipo inmunoglobulina y dominios de tipo FCE (TIE) (por ejemplo, TIE-1, TIE-2/TEK), Tec, TYRO10, receptores de factor de crecimiento similar a insulina (FCI) (por ejemplo, INS-R, IGF-IR, IR-R), receptores de dominio discoidina (DD) (por ejemplo, RDD1, RDD2), receptor de c-Met (MET), receptor de Nantes (RDN), también conocido como receptor estimulador de macrófagos 1, tirosina quinasa 3 relacionada con Flt3 fms (Flt3), receptor de factor estimulantes de colonias 1(FEC1), receptor de c-kit (KIT, o SCFR) y receptores relacionados con el receptor de insulina (RRI).

35 En algunas realizaciones, la molécula de señalización celular intracelular se selecciona de entre el grupo que consiste de: AKT, abl, cbl, erbA, ERK, fes, fgr, fms, fos, jun, met, myb, myc, PI3K, raf, ret, ryk y src. En una realización preferente, la presente invención se refiere a un agente ligante bivalente que se une a un polipéptido diana modificado post-traduccionalmente que consiste de dos ligantes monovalentes que se encuentran unidos entre sí mediante un conector, en el que: a) el primer ligante monovalente se une a un epítipo de dicho polipéptido diana, b) el segundo ligante monovalente se une a una modificación post-traduccional del polipéptido, c) cada ligante monovalente presenta una K_{dis} comprendida en el intervalo de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, y d) el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior, y en el que la modificación post-traduccional es la fosforilación. Se da a conocer además una modificación post-traduccional seleccionada de entre ubiquitinilación y glucosilación.

40 En una realización preferente, las propiedades de tasa cinética de cada ligante monovalente y del agente ligante bivalente se caracterizan mediante tecnología de RPS Biacore, tal como se indica en detalle en los ejemplos.

45 El agente ligante bivalente según la presente invención se une a un polipéptido diana que presenta una modificación post-traduccional, en la que la modificación post-traduccional es la fosforilación.

Tal como se ha comentado, un ligante monovalente para la utilización en la construcción de un agente ligante bivalente tal como se da a conocer en la presente memoria presenta una K_{dis} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$.

Preferentemente, el primer ligante monovalente se une específicamente a un epítipo de polipéptido. Es decir, dicho ligante se une a un epítipo que no se somete a una modificación secundaria o alternativamente se une específicamente al epítipo nativo (no modificado secundariamente). La unión específica a un epítipo de polipéptido se identifica en el caso de que dicho ligante presenta una K_{dis} que sea por lo menos 20 veces inferior para el polipéptido no modificado post-traduccionalmente en comparación con el mismo polipéptido portador de una modificación post-traducciona. También preferentemente, la K_{dis} del primer ligante monovalente al polipéptido no modificado es por lo menos 30, 40, 50, 80, 90, 95 o por lo menos 100 veces más alto que el mismo polipéptido portador de una modificación post-traducciona en el epítipo de polipéptido unido al primer ligante monovalente.

Preferentemente, el segundo ligante monovalente se une específicamente a una modificación post-traducciona del polipéptido, es decir, dicho ligante presenta una K_{dis} que es por lo menos 20 veces inferior a un polipéptido que porta dicha fosforilación post-traducciona que en el mismo polipéptido no fosforilado post-traduccionalmente. También preferentemente, la K_{dis} del segundo ligante monovalente al polipéptido portador de una modificación post-traducciona es por lo menos 30, 40, 50, 80, 90, 95 o por lo menos 100 veces inferior a la del mismo polipéptido no modificado.

Tal como se ha indicado anteriormente, el agente ligante bivalente según la presente invención presentará una K_{dis} de como máximo $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior, es decir, será mejor.

En una realización en el agente ligante bivalente según la presente invención cada ligante monovalente presenta una K_{dis} de entre $2 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$.

En una realización en el agente ligante bivalente según la presente invención cada ligante monovalente presenta una K_{dis} de entre $10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$.

Los aparatos de tinción inmunohistoquímica automática distribuidos por Ventana Medical Systems Inc., Tucson, utilizan condiciones de lavado bastante restrictivas. Un anticuerpo utilizado en la serie de analizadores BenchMark® debería presentar una K_{dis} de como máximo $5 \times 10^{-5}/s$ para proporcionar una intensidad de tinción razonable. Cuanto mejor sea la K_{dis} , mejor será la intensidad de la tinción. El agente ligante bivalente dado a conocer en la presente memoria presenta una K_{dis} de como máximo $3 \times 10^{-5}/s$. En una realización adicional, el agente ligante bivalente tal como se da a conocer en la presente memoria presenta una K_{dis} de $2 \times 10^{-5}/s$ o inferior o también preferentemente $10^{-5}/s$ o inferior.

En una realización, las propiedades de tasa cinética de cada ligante monovalente y del agente ligante bivalente se caracterizan mediante tecnología de RPS Biacore™, tal como se indica en detalle en los ejemplos.

El agente ligante bivalente según la presente invención contiene un conector. Tal como se da a conocer en la presente memoria, el conector puede unir covalentemente los dos ligantes monovalentes. Según la invención, el conector y los ligantes monovalentes pueden unirse mediante dos parejas de unión específicas diferentes, a:a' y b:b'.

Tal como se da a conocer en la presente memoria, el conector puede estar compuesto, por ejemplo, de monómeros apropiados, unidos entre sí y a los dos ligantes monovalentes mediante enlaces covalentes. Preferentemente, el conector contiene fracciones de azúcar, fracciones de nucleótidos, fracciones de nucleósidos y/o aminoácidos. En determinadas realizaciones preferentes, el conector consiste esencialmente de nucleótidos, análogos de nucleótido o aminoácidos.

Tal como se da a conocer en la presente memoria, el conector que une covalentemente, o que une los dos ligantes monovalentes mediante parejas de unión, presenta una longitud de entre 6 y 100 nm. Se da a conocer además que el conector presenta una longitud de entre 6 y 50 nm o de entre 6 y 40 nm. En una realización preferente de la invención, el conector presenta una longitud de 10 nm o superior o de 15 nm o superior. El conector comprendido en un agente ligante bivalente según la presente invención presenta una longitud de entre 10 nm y 50 nm.

La longitud de las entidades no nucleosídicas de un conector dado (a-S-b) en teoría y mediante métodos complejos puede calcularse mediante la utilización de distancias de enlace y ángulos de enlace conocidos de compuestos que son químicamente similares a las entidades no nucleosídicas. Dichas distancias de enlace se resumen para algunas moléculas en libros de texto estándares: CRC Handbook of Chemistry and Physics, 91a edición, 2010-2011, sección 9. Sin embargo, las distancias de enlace exactas varían para cada compuesto. También existe variabilidad en los ángulos de los enlaces.

Por lo tanto, resulta más práctico utilizar un parámetro promedio (una aproximación fácil de entender) en dicho cálculo.

En el cálculo de una longitud de espaciador o de conector, se aplican las aproximaciones siguientes: a) para el cálculo de las longitudes de las entidades no nucleosídicas, se utiliza una longitud de enlace promedio de 130 pm con un ángulo de enlace de 180° con independencia de la naturaleza de los átomos unidos, b) un nucleótido en una cadena sencilla se calcula en 500 pm, y c) un nucleótido en una doble cadena se calcula en 330 pm.

El valor de 130 pm se basa en el cálculo de la distancia de los dos átomos de carbono terminales de una cadena C(sp³)-C(sp³)-C(sp³) con un ángulo de enlace de 109°28' y una distancia de 153 pm entre los dos C(sp³), que es de aprox. 250 pm, que se traduce en un ángulo de enlace supuesto de 180° y una distancia de enlace entre los dos C(sp³) de 125 pm. Considerando que algunos heteroátomos como P y S y átomos de carbono sp² y sp¹ también podrían ser parte del espaciador, se adopta el valor de 130 pm. En el caso de que un espaciador comprenda una estructura cíclica como cicloalquilo o arilo, se calcula la distancia de manera análoga mediante el recuento del número de enlaces de dicha estructura cíclica que son parte de la cadena global de átomos que definen la distancia.

Tal como se da a conocer el conector puede unir covalentemente los dos ligantes monovalentes. Según un aspecto de la invención, el conector y los ligantes monovalentes pueden unirse mediante dos parejas de unión específica diferentes, a:a' y b:b'. Por lo tanto, el agente ligante bivalente según la presente invención, ligante de un polipéptido diana modificado post-traduccionalmente, puede ilustrarse mediante la fórmula I, a continuación:



en la que A es un primer ligante monovalente, de unión a un epítipo de polipéptido de dicho polipéptido diana, en la que B es un segundo ligante monovalente, de unión a la fosforilación post-traduccionale, en la que cada ligante monovalente A y B presenta una K_{dis} comprendida en el intervalo de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, en la que a:a' , así como b:b', son independientemente una pareja de unión o a'a y/o b:b' se encuentran unidos covalentemente, en la que a'a y b:b' son diferentes, en la que S es un espaciador, en la que - representa un enlace covalente, en la que el conector a - S - b presenta una longitud de entre 10 nm y 50 nm y en la que el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior.

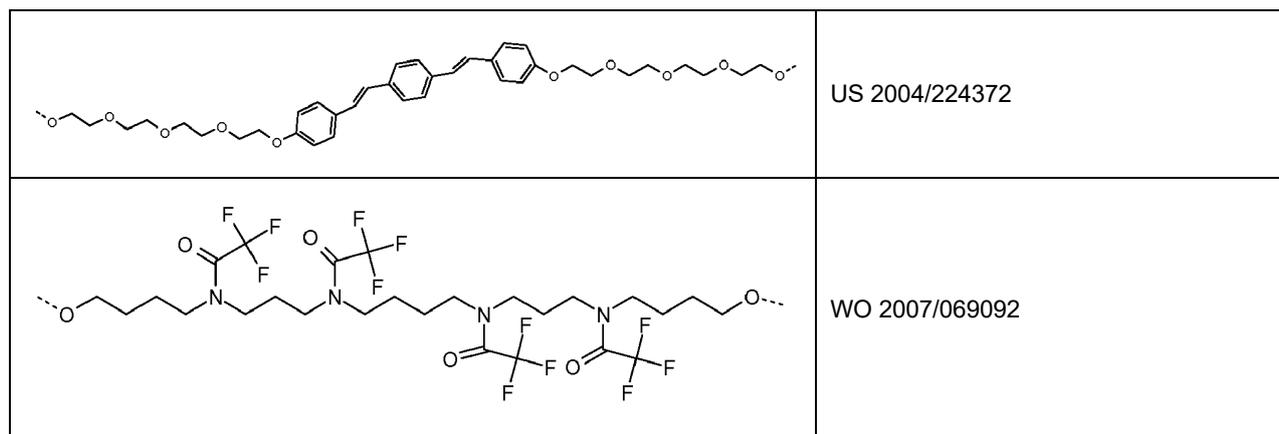
Se da a conocer un conector L que consiste de a - S - b que presenta una longitud de entre 6 y 100 nm. Preferentemente, el conector L que consiste de a - S - b que presenta una longitud de entre 6 y 80 nm. Se da a conocer además que el conector presenta una longitud de entre 6 y 50 nm o de entre 6 y 40 nm. En realizaciones específicas de la invención, el conector presenta una longitud de 10 nm o superior o de 15 nm o superior. Según la presente invención, el conector presenta una longitud de entre 10 nm y 50 nm. En una realización, a y b, respectivamente, son elementos de la pareja de unión y presenta una longitud de por lo menos 2,5 nm cada uno.

El espaciador S puede construirse como se requiera para proporcionar, por ejemplo, la longitud deseada, así como para otras propiedades deseadas. El espaciador puede estar, por ejemplo, compuesto total o parcialmente de aminoácidos naturales o no naturales, de unidades de fosfato-azúcar, por ejemplo un esqueleto similar a ADN sin nucleobases, o estructuras glucopeptídicas, o por lo menos parcialmente unidades sacáridas o por lo menos parcialmente subunidades polimerizables tales como glicoles o acrilamida.

La longitud del espaciador S en un compuesto según la presente invención puede modificarse según se desee. Con el fin de poner a fácil disposición espaciadores de longitud variable, una biblioteca, resulta preferente disponer de un simple acceso sintético a los espaciadores de dicha biblioteca. Resulta preferente una síntesis en fase sólida combinatorial de un espaciador. Debido a que los espaciadores deben sintetizarse hasta una longitud de aproximadamente 100 nm, se selecciona una estrategia de síntesis de manera que se ensamblan bloques constructivos sintéticos monoméricos durante la síntesis en fase sólida con un alta eficiencia. La síntesis de desoxioligonucleótidos basada en el ensamblaje de fosforamida como bloques constructivos monoméricos cumple perfectamente dichos requisitos. En dicho espaciador se unen unidades monoméricas dentro del espaciador, en cada caso mediante una fracción fosfato o análogo de fosfato.

El espaciador S puede contener grupos libres cargados positiva y/o negativamente de ácidos aminocarboxílicos polifuncionales, por ejemplo amino, carboxilato o fosfato. Por ejemplo, los portadores de carga pueden derivarse de ácidos aminocarboxílicos trifuncionales que contienen: a) un grupo amino y dos grupos carboxilato, o b) dos grupos amino y un grupo carboxilato. Son ejemplos de dichos ácidos aminocarboxílicos trifuncionales, lisina, ornitina, hidroxilisina, ácido α,β -diamino-propiónico, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, ácido carboxi-glutámico y ácidos carboxílicos trifuncionales simétricos tales como los indicados en los documentos n° EP-A-0 618 192 o n° US-A-5.519.142. Alternativamente, uno de los grupos carboxilato en los ácidos aminocarboxílicos trifuncionales a) puede sustituirse con un grupo fosfato, sulfonato o sulfato. Un ejemplo de dicho aminoácido trifuncional es fosfoserina.

El espaciador S puede contener además grupos hidrofílicos no cargados. Son ejemplos preferentes de grupos hidrofílicos no cargados, grupos de óxido de etileno o de óxido de polietileno con preferentemente por lo menos tres unidades óxido de etileno, sulfóxido, sulfona, amida de ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, amida de ácido fosfónico, éster de ácido fosfónico, amida de ácido fosfórico, éster de ácido fosfórico, amida de ácido sulfónico, éster de ácido sulfónico, amida de ácido sulfúrico y éster de ácido sulfúrico. Los grupos amida preferentemente son grupos de amida primaria, particularmente preferentemente residuos amida de ácido carboxílico en grupos laterales



Una manera simple de construir el espaciador S o de introducir fracciones espaciadores en el espaciador S es utilizar bloques constructivos de fosoramidita D- o L-nucleósido estándar. En una realización, se utiliza un tramo de cadena sencilla de dT. Lo anterior resulta ventajoso debido a que dT no porta un grupo protector de base.

5 Puede utilizarse la hibridación con el fin de modificar la longitud del espaciador (distancia entre los elementos de la pareja de unión a y b) y la flexibilidad del espaciador debido a que se reduce la longitud de la doble cadena en comparación con la de la cadena sencilla y una doble cadena es más rígida que una cadena sencilla.

10 Para la hibridación, en una realización se utilizan oligonucleótidos modificados con una fracción funcional X. El oligonucleótido utilizado para la hibridación puede presentar una o dos extensiones terminales que no se hibridan con el espaciador y/o se encuentra ramificado internamente. Dichas extensiones terminales que no son hibridantes con el espaciador (y que no interfieren con las parejas de unión a:a' y b:b') pueden utilizarse para sucesos de hibridación adicionales. En una realización, un oligonucleótido hibridante con una extensión terminal es un oligonucleótido marcado. Dicho oligonucleótido marcado nuevamente puede comprender extensiones terminales o ser ramificado con el fin de permitir la hibridación adicional; de esta manera puede obtenerse un agregado polinucleótido o dendrímero. Preferentemente se utiliza un dendrímero poli-ácido oligonucleico para producir un polimarcaje o con el fin de obtener una concentración local elevada de X.

20 Se da a conocer en la presente memoria un espaciador S que presenta una longitud de esqueleto de entre 1 y 100 nm. En otras palabras, los grupos a y b de fórmula I están separados por una distancia de entre 1 y 100 nm. Además se da a conocer en la presente memoria que cada uno de a y b, respectivamente, es un elemento de pareja de unión y el espaciador S presenta una longitud de esqueleto de entre 1 y 95 nm.

25 "a:a", así como "b:b", cada uno independientemente, representa una pareja de unión o representa a'a y/o b:b' unido covalentemente, respectivamente.

30 "a:a" así como "b:b" son diferentes. El término diferente indica que la unión de a a a' (unión o acoplamiento covalente intra-pareja de unión) no interfiere con la unión o acoplamiento covalente intra-pareja de unión de la otra pareja b a b', y viceversa.

Tal como se da a conocer en la presente memoria, a'a o b:b' pueden unirse covalentemente. Según la invención, b:b' y a'a, respectivamente, representan una pareja de unión.

35 Tal como se da a conocer en la presente memoria tanto a'a como b:b' pueden unirse covalentemente.

Las reacciones de acoplamiento entre a'a y b:b' son diferentes y se seleccionan de entre protocolos estándares. Dependiendo de la naturaleza de la pareja de unión y del espaciador, se seleccionan reacciones de conjugación apropiadas.

40 La reacción utilizada en el acoplamiento de (a') con (a), es decir, en el acoplamiento A-(a') a un conector que comprende (a), no interfiere con la reacción utilizada en el acoplamiento (b) con (b'), es decir, en el acoplamiento (b')-B con un conector que comprende (b). Tal como apreciará el experto en la materia, los sitios reactivos (a), (a'), (b) y (b'), respectivamente, que conducen al enlace covalente a'a así como b:b', respectivamente, preferentemente tampoco interfieren con cualquier grupo funcional que podría encontrarse presente en un ligante monovalente (A y/o B de fórmula I).

45 En el caso de que por lo menos uno de los ligantes monovalentes sea una proteína, un péptido o un mimético de péptido, probablemente porta uno o más grupos OH, COOH, NH₂ y/o SH, que podrían reaccionar potencialmente

con determinados reactivos de acoplamiento. Dicha reacción (lateral) puede evitarse mediante la selección de, por ejemplo, las reacciones de acoplamiento proporcionadas en la Tabla II.

La Tabla II proporciona una vista general de los grupos reactivos utilizados rutinariamente para la unión de A-(a') y (b')-B, respectivamente, a (a) y (b), respectivamente, uniendo ambos covalentemente al conector (a-S-b).

5

Tabla II:

Sitio reactivo (a') en A-(a')	Sitio reactivo (a) del conector L: (a)-S-(b)	Sitio reactivo (b) del conector L: (a)-S-(b)	Sitio reactivo (b') en (b')-B
ONH ₂ (aminoxi)	C(H)=O (aldehído)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfina-carboxílico	N3 (azida)
C(H)=O (aldehído)	ONH ₂ (aminoxi)	N3 (azida)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfina-carboxílico
ONH ₂ (aminoxi)	C(H)=O (aldehído)	Dieno	Dienófilo
C(H)=O (aldehído)	ONH ₂ (aminoxi)	Dienófilo	Dieno
Dieno	Dienófilo	N3 (azida)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfina-carboxílico
Dienófilo	Dieno	N3 (azida)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfina-carboxílico
Dienófilo	Dieno	--C≡C (alquino) o éster trifenilfosfina-carboxílico	N3 (azida)
Dieno	Dienófilo	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfina-carboxílico	N3 (azida)

Las reacciones de acoplamiento biortogonal anteriormente indicadas resultan apropiadas, por ejemplo, en el caso de que por lo menos uno de los ligantes monovalentes sea un polipéptido. En el caso de que dos parejas de unión no porten determinados grupos funcionales reactivos, por ejemplo en el caso de la combinación de dos aptámeros, como los ligantes monovalentes A y B, respectivamente, existe mayor libertad en la selección de los sitios reactivos (a'), (a), (b) y (b'), respectivamente. Por lo tanto, adicionalmente o en combinación con las parejas de los sitios reactivos correspondientes proporcionados en la tabla anterior, puede utilizarse éster amino/activo (por ejemplo éster de NHS) y SH/SH o SH/maleimido, para el acoplamiento ortogonal.

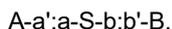
10

15

Tal como resultará evidente a partir de los ejemplos anteriormente indicados, por lo menos uno de los enlaces covalentes entre a':a y entre b':b', respectivamente, no es un enlace peptídico alfa-amino. También resulta preferente que ambos enlaces covalentes no sean enlaces peptídicos alfa-amino.

20

Según la presente invención, tanto a':a como b':b' son una pareja de unión. En un aspecto, la presente invención se refiere a un agente de unión biespecífica de fórmula I:



25

en la que A es un primer ligante monovalente, de unión a un epítipo de polipéptido de dicho polipéptido diana, en la que B es un segundo ligante monovalente, de unión a la fosforilación post-traducciona en un polipéptido diana, en la que cada ligante monovalente A y B presenta una K_{dis} comprendida en el intervalo de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, en la que a':a, así como b':b', son independientemente una pareja de unión y son diferentes, en la que S es un espaciador, en la que - representa un enlace covalente, en la que el conector a - S - b presenta una longitud de entre 10 nm y 50 nm y en la que el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior.

30

En dicho aspecto, a y a' son los elementos de la pareja de unión a':a, y b y b' son los elementos de la pareja de unión b':b', respectivamente. Preferentemente, cada elemento de una pareja de unión presenta un peso molecular de 10 kD o inferior. En realizaciones adicionales también preferentes, el peso molecular de cada ligante de dichas parejas de unión presenta un peso de 8, 7, 6, 5 o 4 kD, o inferior.

35

Tal como se da a conocer en la presente memoria, a':a y b':b' pueden ser parejas de unión y los elementos de las parejas de unión a':a y b':b' son dímeros de dominio de cremallera de leucinas. Según la presente invención, ambas parejas de unión son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes.

40

En el caso de que a':a o b':b represente una pareja de unión, la afinidad de unión para (dentro de) dicha pareja de unión es de por lo menos 10^8 l/mol. Ambas parejas de unión son diferentes. Para una pareja de unión la diferencia se identifica, por ejemplo, en el caso de que la afinidad para la unión recíproca, por ejemplo la unión de a, así como de a', a b o a b', sea 10% de la afinidad dentro de la pareja a':a' o inferior. También resulta preferente que la unión recíproca, es decir, la unión de a así como a' a b o a b', respectivamente, es 5% de la afinidad dentro de la pareja a':a' o inferior, o en el caso de que sea 2% de la afinidad dentro de la pareja a':a' o inferior. En una realización, la diferencia es tan pronunciada que la unión recíproca (de reactividad cruzada) sea 1% o inferior a la afinidad de unión específica dentro de una pareja de unión.

45

La expresión "dominio de cremallera de leucinas" se utiliza para referirse a un dominio de dimerización reconocido comúnmente que se caracteriza por la presencia de un residuo de leucina cada séptimo residuo en un tramo de aproximadamente 35 residuos. Los dominios de cremallera de leucinas son péptidos que estimulan la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucinas se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz W.H. et al., Science 240:1759-1764, 1988) y desde entonces se han encontrado en una diversidad de diferentes proteínas. Entre las cremalleras de leucinas conocidas se encuentran péptidos naturales y derivados de los mismos que se dimerizan o se trimerizan. Se describen ejemplos de dominios de cremallera de leucinas adecuados para producir proteínas multiméricas solubles en la solicitud de patente PCT nº WO 94/10308, y la cremallera de leucinas derivada de la proteína D surfactante pulmonar (PDS) descrita en Hoppe H.J. et al., FEBS Lett. 344:191-195, 1994.

Los dominios de cremallera de leucinas forman dímeros (parejas de unión) que se mantienen unidos mediante una hélice arrollada en hélice alfa. Una hélice superenrollada presenta 3,5 residuos por giro, lo que implica que cada séptimo residuo ocupa una posición equivalente con respecto al eje de la hélice. La matriz regular de leucinas dentro de la hélice superenrollada estabiliza la estructura mediante interacciones hidrofóbicas y de van der Waals.

En el caso de que los dominios de cremallera de leucinas formen la primera pareja de unión (a':a) y la segunda pareja de unión (b:b'), ambas secuencias de cremallera de leucinas son diferentes, es decir, las secuencias a y a' no se unen a b y b'. Los dominios de cremallera de leucinas pueden aislarse a partir de proteínas naturales que es conocido que contienen dichos dominios, tales como factores de transcripción. Un dominio de cremallera de leucinas puede proceder, por ejemplo, del factor de transcripción fos y un segundo, del factor de transcripción jun. Los dominios de cremallera de leucinas también pueden diseñarse y sintetizarse artificialmente utilizando técnicas estándares para la síntesis y el diseño conocidas de la técnica.

Tal como se da a conocer en la presente memoria, ambos elementos de las parejas de unión a':a y b:b', es decir, a, a', b y b' pueden ser dominios de cremallera de leucinas y el espaciador S consiste de aminoácidos. En dicha realización dada a conocer, resulta fácilmente posible producir el constructo a-S-b. Modificando la longitud de dicho espaciador S tal como se desee resultará sencillo para el experto en la materia. Dicho polipéptido puede sintetizarse o producirse recombinantemente.

Por ejemplo, pueden expresarse proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido espaciador fusionado con un péptido cremallera de leucinas en el extremo N-terminal y con un péptido cremallera de leucinas en el extremo C-terminal, en células huésped adecuadas siguiendo técnicas estándares. Puede insertarse una secuencia de ADN codificante de un espaciador peptídico deseado entre una secuencia codificante de un elemento de un primer dominio cremallera de leucinas a y en el mismo marco de lectura, una secuencia de ADN codificante de un elemento de un segundo dominio cremallera de leucinas b.

El espaciador S, en el caso de que el conector a-S-b sea un polipéptido, en una realización comprende una o varias veces un motivo de secuencia de aminoácidos GGGGS (SEC ID nº 13). El espaciador S puede comprender además una secuencia de etiqueta. La secuencia de etiqueta puede seleccionarse de entre las etiquetas de reconocimiento de proteínas utilizadas comúnmente, tales como YPYDVPDYA (etiqueta HA) (SEC ID nº 14) o GLNDIFEAQKIEWHE (etiqueta Avi) (SEC ID nº 15).

Según la presente invención, ambas parejas de unión (a':a) y (b:b') son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes.

Tal como ya indica la nomenclatura, a y a', así como b y b', se hibridan entre sí. Las secuencias de ácidos nucleicos comprendidas en a y a' por una parte, y en b y b', por otra parte, son diferentes. En otras palabras, las secuencias en la pareja de unión a':a no se unen a las secuencias de la pareja de unión b:b', respectivamente, y viceversa. En una realización, la presente invención se refiere a por lo menos un agente ligante dual de fórmula I, en la que las parejas de unión a:a' y b:b', respectivamente, ambas son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes y en las que las secuencias de ácidos nucleicos hibridantes de las diferentes parejas de unión a':a y b:b' no se hibridan entre sí. En otras palabras, a y a' se hibridan entre sí pero no se unen a cualquier de b o b' ni interfieren con su hibridación, y viceversa. La cinética de la hibridación y la especificidad de la hibridación pueden monitorizarse fácilmente mediante análisis de los puntos de fusión. La hibridación específica de una pareja de unión (por ejemplo a:a') y la no interferencia (por ejemplo con b o b') se identifica en el caso de que la temperatura de fusión para la pareja a:a' comparada con cualquier posible combinación con b o b', respectivamente (es decir, a:b, a:b', a:b o a':b) sea por lo menos 20°C más alta.

Las secuencias de ácidos nucleicos que forman una pareja de unión, por ejemplo (a:a') o cualquier pareja de unión basada en una secuencia de ácidos nucleicos, puede comprender cualquier nucleobase natural o un análogo de la misma y puede presentar un esqueleto modificado o no modificado tal como se ha indicado anteriormente, con la condición de que sea capaz de formar un dúplex estable mediante el apareamiento de múltiples bases. El término estable se refiere a que la temperatura de fusión del dúplex es superior a 37°C. Preferentemente, la doble cadena consiste de dos cadenas sencillas totalmente complementarias. Sin embargo, son posibles apareamientos incorrectos o inserciones con la condición de que sea estable a 37°C.

Tal como apreciará el experto en la materia, un dúplex de ácidos nucleicos puede estabilizarse adicionalmente mediante el entrecruzamiento entre cadenas. El experto en la materia conocerá varios métodos de entrecruzamiento apropiados, por ejemplo métodos que utilizan psoralén o basados en tionucleósidos.

- 5 Las secuencias de ácidos nucleicos que representan los elementos de una pareja de unión preferentemente consisten de entre 12 y 50 nucleótidos. También resulta preferente que dichas secuencias de ácidos nucleicos consistan de entre 15 y 35 nucleótidos.

10 Las ARNasas son ubicuas y debe tenerse especial cuidado en evitar la digestión no deseada de las parejas de unión y/o secuencias espaciadoras basadas en ARN. Aunque ciertamente resulta posible utilizar, por ejemplo, parejas de unión y/o espaciadores basados en ARN y las parejas de unión y/o espaciadores basados en ADN representan una realización preferente.

15 Pueden diseñarse fácilmente secuencias de ácidos nucleicos hibridantes apropiadas, proporcionando más de dos parejas de oligonucleótidos complementarios ortogonales, lo que permite la fácil generación y utilización de más de dos parejas de unión. Otra ventaja de utilizar secuencias de ácidos nucleicos hibridantes en un agente ligante dual de la presente invención es que las modificaciones pueden introducirse fácilmente en las secuencias de ácidos nucleicos. Los bloques constructivos modificados se encuentran disponibles comercialmente, permitiendo, por ejemplo, la fácil síntesis de un conector que comprende una fracción funcional. Dicha fracción funcional puede introducirse fácilmente en cualquier posición deseada y en cualquiera de las estructuras a y a', así como b y b' y/o S, con la condición de que representen un oligonucleótido.

20 En una realización preferente, el espaciador S comprendido en un agente ligante según la fórmula I es un ácido nucleico. En una realización preferente, ambas parejas de unión son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes y el espaciador S también es un ácido nucleico. En dicha realización, el conector L consistente de a - S - b es un oligonucleótido.

25 En el caso de que el espaciador S así como las secuencias a, a', b y b' sean todas secuencias oligonucleótidas, resulta fácilmente posible proporcionar y sintetizar un único oligonucleótido que represente el conector L, comprendiendo S y los elementos a y b de las parejas de unión a':a y b':b', respectivamente. En el caso de los ligantes monovalentes A y B, respectivamente, sean polipéptidos, cada uno de ellos puede acoplarse fácilmente con las secuencias de ácidos nucleicos hibridantes a' y b', respectivamente. La longitud del espaciador S comprendido en dicho constructo puede modificarse fácilmente de cualquier manera deseada. Basándose en los tres constructos a-S-b, A-a' y b'-B, el agente de unión de fórmula I puede obtenerse más fácilmente según procedimientos estándares mediante hibridación entre a':a y b':b', respectivamente. En el caso de que se utilicen espaciadores de longitud diferente, los constructos resultantes permiten agentes de unión dual de otro modo idénticos pero que presentan una distancia diferente entre los ligantes monovalentes A y B. Ello permite una distancia y/o flexibilidad óptima.

30 En una realización preferente, el espaciador S, así como las secuencias a, a', b y b' son de ADN.

35 El L-ADN enantiomérico es conocido por su comportamiento de hibridación ortogonal, su resistencia a nucleasas y su facilidad de síntesis de oligonucleótidos de longitud variable. Dicha fácil variabilidad en la longitud de conector mediante el diseño de espaciadores apropiados resulta importante para optimizar la unión de un agente de unión tal como se da a conocer en la presente memoria a su antígeno o antígenos.

40 En una realización preferente, el conector L (=a-S-b) es L-ADN o L-ARN enantiomérico. En una realización preferente, el conector a-S-b es L-ADN enantiomérico. En una realización preferente, a, a', b y b', así como el espaciador S, son de L-ADN o L-ARN enantiomérico. En una realización preferente, a, a', b y b', así como el espaciador S, son de L-ADN enantiomérico.

45 En una realización, el espaciador S es un oligonucleótido y se sintetiza en dos partes que comprenden extremos hibridables entre sí. En este caso, el espaciador S puede construirse simplemente mediante la hibridación entre sí de dichos extremos hibridables. El constructo espaciador resultante comprende una parte oligonucleótida dúplex. Tal como resultará evidente, en el caso de que el espaciador se construya de dicha manera, la secuencia de la entidad oligonucleótida hibridable que forma dicho dúplex se selecciona de manera que no pueda producirse hibridación o interferencia con las parejas de unión a':a' y b':b'.

50 Tal como se da a conocer en la presente memoria, los ligantes específicos monovalentes A y B de fórmula I pueden ser ácidos nucleicos. En una de las realizaciones dadas a conocer, a', a, b, b', A, B y S son todas secuencias oligonucleótidas. En la presente realización, las subunidades A-a', a-S-b y b'-B de fórmula I pueden sintetizarse fácil e independientemente siguiendo procedimientos estándares y combinarse mediante hibridación según procedimientos estándares convenientes.

55 Tal como se ha comentado en detalle anteriormente, el acoplamiento puede ser covalente o puede ser mediante parejas de unión específicas.

Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, el agente ligante bivalente según la presente invención puede modificarse adicionalmente para portar una o más fracciones funcionales. Dicha fracción funcional X preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de un grupo ligante, un grupo de marcaje, un grupo efector y un grupo reactivo.

5 En el caso de que se encuentre presente más de una fracción funcional X, cada una de dichas fracciones funcionales puede en cada caso ser independientemente un grupo ligante, un grupo de marcaje, un grupo efector o un grupo reactivo.

10 En una realización, la fracción funcional X preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de un grupo ligante, un grupo de marcaje y un grupo efector.

En una realización, el grupo X es un grupo ligante. Tal como resultará evidente para el experto en la materia, el grupo ligante X se selecciona para que no presente interferencia con las parejas a':a y b':b'.

15 Son ejemplos de grupos ligantes las parejas de una pareja de unión bioafín que pueden interactuar específicamente con la otra pareja de la pareja de unión bioafín. Dichas parejas de unión bioafines adecuadas son hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina, tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina y avidina o estreptavidina; azúcar y lectina, oligonucleótido y oligonucleótido complementario, receptor y ligando, por ejemplo receptor de hormona esteroidea y hormona esteroidea. En una realización, X es un grupo ligante y se encuentra unido covalentemente a por lo menos uno de entre a', a, b, b' o S del compuesto de fórmula I. Preferentemente, la pareja más pequeña de una pareja de unión bioafín, por ejemplo la biotina o un análogo de la misma, un ligando de receptor, un hapteno o un oligonucleótido se une covalentemente a por lo menos uno de entre a', a, L, b o b' tal como se han definido anteriormente.

25 En una realización, la fracción funcional X es un grupo ligante seleccionando de entre hapteno, biotina o análogos de biotina, tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina, oligonucleótido y hormona esteroidea.

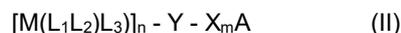
En una realización, la fracción funcional X es un grupo reactivo. El grupo reactivo puede seleccionarse de entre cualquier grupo reactivo conocido, tal como amino, sulfhidrilo, carboxilato, hidroxilo, azido, alquínilo o alquénilo. En una realización, el grupo reactivo se selecciona de entre maleimido, succinimidilo, ditiopiridilo, éster de nitrofenilo y éster de hexafluorofenilo.

30 En una realización, el grupo reactivo se selecciona de entre maleimido, succinimidilo, ditiopiridilo, éster de nitrofenilo y éster de hexafluorofenilo.

35 En una realización, la fracción funcional X es un grupo de marcaje. El grupo de marcaje puede seleccionarse de entre cualquier grupo detectable conocido. El experto en la materia seleccionará el número de marcajes apropiado para una sensibilidad óptima con una extinción mínima.

40 El grupo de marcaje puede seleccionarse de entre cualquier grupo detectable conocido. En una realización, el grupo de marcaje puede seleccionarse de entre pigmentos tales como grupos de marcaje luminiscente, tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos, o pigmentos fluorescentes, por ejemplo fluoresceína, coumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos, complejos de metal luminiscente, tales como complejos de rutenio o de europio, enzimas tales como los utilizados para el CEDIA (por sus siglas en inglés, inmunoensayo de donante enzimático clonado, por ejemplo la patente EP nº 0 061 888), micropartículas o nanopartículas, por ejemplo partículas de látex o soluciones metálicas, e isótopos radioactivos.

45 En una realización, el grupo de marcaje es un complejo de metal luminiscente y el compuesto presenta una estructura de fórmula general (II):



50 en la que M es un catión metálico divalente o trivalente seleccionado de entre iones tierras raras o metales de transición, L₁, L₂ y L₃ son iguales o diferentes y representan ligandos con por lo menos dos heterocíclicos que contienen nitrógeno, en los que L₁, L₂ y L₃ se encuentran unidos al catión metálico mediante átomos de nitrógeno, X es un grupo funcional reactivo que se encuentra unido covalentemente a por lo menos uno de los ligandos L₁, L₂ y L₃ mediante un conector Y, n es un número entero entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 4, m es 1 o 2 y preferentemente 1, y A se refiere al contraión que puede resultar necesario para equalizar la carga.

55 El complejo metálico preferentemente es un complejo de metal luminiscente, es decir, un complejo metálico que experimenta una reacción de luminiscencia detectable tras una excitación apropiada. La reacción de luminiscencia puede detectarse, por ejemplo, mediante medición de la fluorescencia o electroquimioluminiscencia. El catión metálico en dicho complejo es, por ejemplo, un metal de transición o un metal tierra rara. El metal preferentemente es rutenio, osmio, renio, iridio, rodio, platino, indio, paladio, molibdeno, tecnecio, cobre, cromo o tungsteno. Resultan particularmente preferentes, rutenio, iridio, renio, cromo y osmio. El más preferente es el rutenio.

60 Los ligandos L₁, L₂ y L₃ son ligandos con por lo menos dos heterociclos que contienen nitrógeno. Resultan preferentes los heterociclos aromáticos, tales como biperidilo, biperazilo, terpiridilo y fenantrolilo. Los ligandos L₁, L₂ y L₃ se seleccionan particularmente preferentemente de entre los sistemas de anillos biperidina y fenantrolina.

- 5 El complejo puede contener adicionalmente uno o varios contraiones A para ecualizar la carga. Son ejemplos de contraiones cargados negativamente adecuados, los halogenuros, OH⁻, el carbonato, alquilcarboxilatos, por ejemplo los grupos trifluoroacetato, sulfato, hexafluorofosfato y tetrafluoroborato. Resultan particularmente preferentes los grupos hexafluorofosfato, trifluoroacetato y tetrafluoroborato. Son ejemplos de contraiones cargados positivamente adecuados, cationes monovalentes tales como los iones metales alcalinos y amonio.
- En una realización preferente adicional, la fracción funcional X es un grupo efector. Un grupo efector preferente es una sustancia terapéuticamente activa.
- 10 Las sustancias terapéuticamente activas presentan diferentes maneras en que resultan eficaces, por ejemplo en la inhibición del cáncer. Pueden dañar el ADN molde mediante alquilación, mediante entrecruzamiento o mediante el corte de la doble cadena del ADN. Otras sustancias terapéuticamente activas pueden bloquear la síntesis del ARN mediante intercalado. Algunos agentes son venenos del huso, tales como los alcaloides vinca, o antimetabolitos que inhiben la actividad enzimática, o agentes hormonales o antihormonales. El grupo efector X puede seleccionarse de entre agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides vinca, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, agentes hormonales y antihormonales y toxinas.
- 15 Los agentes alquilantes actualmente más preferentes pueden ejemplificarse por ciclofosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, tiotepa, ifosfamida y mostaza nitrogenada.
- Los antimetabolitos actualmente más preferentes pueden ejemplificarse por: metotrexato, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido, 6-tioguanina y 6-mercaptopurina.
- 20 Los antibióticos antitumorales actualmente más preferentes pueden ejemplificarse por: doxorubicina, daunorrubicina, idorrubicina, nimitoxantrona, dactinomicina, bleomicina, mitomicina y plicamicina.
- Los venenos del huso actualmente más preferentes pueden ejemplarse en: maitansina y maitansinoides, alcaloides vinca y epipodofilotoxinas, ejemplificadas por vincristina, vinblastina, vindesina, etopósido y tenipósido.
- 25 Las nitrosoureas actualmente más preferentes pueden ejemplificarse por carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina.
- Los agentes hormonales y antihormonales actualmente más preferentes pueden ejemplificarse por adrenocorticoides, estrógenos, antiestrógenos, progestinas, inhibidores de aromatasas, andrógenos y antiandrógenos.
- 30 Los agentes sintéticos aleatorios preferentes adicionales pueden ejemplificarse por dacarbazina, hexametilmelamina, hidroxiiurea, mitotano, procarbazida, cisplatino y carboplatino.
- 40 Una fracción funcional X se encuentra unida covalentemente o mediante una pareja de unión adicional, por ejemplo a por lo menos uno de entre (a'), (a), (b), (b') o S. La fracción funcional X puede aparecer una o varias (n) veces. (n) es un número entero 1 o más. Preferentemente (n) es un número entre 1 y 100. También resulta preferente que (n) sea un número entre 1 y 50. En determinadas realizaciones, n es un número entre 1 y 10, o entre 1 y 5. En realizaciones adicionales, n es 1 o 2.
- 45 Para la unión covalente de la fracción funcional X a por lo menos uno de entre a', a, b, b' o S, puede utilizarse cualquier reacción de acoplamiento apropiada. El experto en la materia podrá seleccionar fácilmente dicha reacción de acoplamiento de entre los protocolos estándares. También resulta posible incorporar una fracción funcional mediante la utilización de bloques constructivos apropiados al sintetizar a', a, b, b' o S.
- 50 En una realización preferente, la fracción funcional X se encuentra unida a a, b o S del agente ligante tal como se ha definido en la fórmula I.
- En una realización preferente, la fracción funcional X se encuentra unida al espaciador S del agente ligante tal como se ha definido en la fórmula I.
- 55 En una realización preferente, la fracción funcional X se encuentra unida a a, b o S del agente ligante tal como se ha definido en la fórmula I.
- 60 En el caso de la fracción funcional X se encuentre situada dentro de un oligonucleótido hibridante representado por a, a', b o b', respectivamente, preferentemente dicha fracción funcional se encuentra unida a un nucleótido modificado o se encuentra unida al átomo P entre nucleósidos (documento nº WO 2007/059816). Se incorporan en dichos oligonucleótidos, nucleótidos modificados que no interfieren con la hibridación de los oligonucleótidos. Dichos nucleótidos modificados preferentemente son pirimidinas sustituidas en C5 o 7-deaza purinas sustituidas en C7.
- 65 Los oligonucleótidos pueden modificarse internamente o en el extremo 5' o 3' con entidades no nucleótidas que se

utilizan para la introducción de una fracción funcional. Preferentemente, dichas entidades no nucleotídicas se encuentran situadas dentro del espaciador S, es decir, entre los dos elementos de la pareja de unión, a y b.

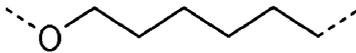
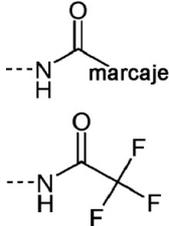
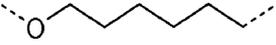
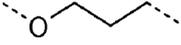
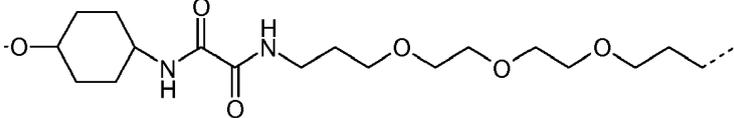
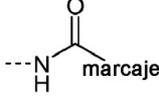
5 Se conocen de la literatura muchos bloques constructivos espaciadores modificadores no nucleotídicos diferentes y se encuentra disponible comercialmente una gran diversidad de los mismos. Para la introducción de una fracción funcional se utilizan bloques constructivos modificadores bifuncionales no nucleosídicos o bloques constructivos modificados trifuncionales no nucleosídicos como VPC para el marcaje terminal o como fosforamidita para el marcaje interno (ver Wojczewski C. et al., Synlett 10:1667-1678, 1999).

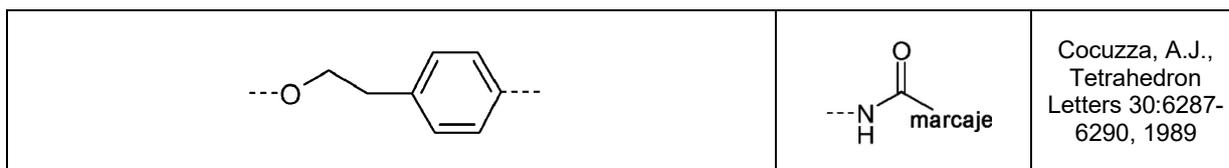
10 Bloques constructivos modificadores bifuncionales

Los bloques constructivos modificadores bifuncionales conectan una fracción funcional o, en caso necesario, una fracción funcional protegida con un grupo fosforamidita para la unión del bloque constructivo en el extremo 5' (síntesis normal) o en el extremo 3' (síntesis invertida) al grupo hidroxilo terminal de una cadena oligonucleotídica en crecimiento.

Los bloques constructivos modificadores bifuncionales preferentemente son compuestos no nucleosídicos. Por ejemplo, dichos bloques constructivos modificados son cadenas de carbonos alquilo, alquenoilo o alquinilo C₂-C₁₈, mientras que dichas cadenas alquilo, alquenoilo o alquinilo pueden interrumpirse con fracciones etilenoxy y/o amida adicionales con el fin de incrementar la hidrofiliidad del espaciador y de esta manera la estructura completa del conector. También pueden utilizarse fracciones cíclicas tales como cicloalquilo C₅-C₆, heterocicloalquilo C₄N, C₅N, C₄O o C₅O-, fenilo sustituido opcionalmente con uno o dos grupos alquilo C₁-C₆, como bloques constructivos modificados bifuncionales no nucleosídicos. Los bloques constructivos bifuncionales modificados preferentes comprenden fracciones alquilo C₃-C₆ y cadenas tri- a hexa-etilenglicol. Se proporcionan ejemplos no limitativos aunque preferentes de bloques constructivos modificadores bifuncionales en la Tabla III, a continuación.

Tabla III:

Bloque constructivo modificador bifuncional no nucleosídico	Introducción de	Referencia
		Pon, R.T., Tetrahedron Letters 32:1715- 1718, 1991 Theisen, P. et al., Nucleic Acids Symposium Series (1992), 27 (Nineteenth Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 99- 100, 1992) EP 0 292 128
		EP 0 523 978
		Meyer, A. et al., Journal of Organic Chemistry 75:3927-3930, 2010
		Morocho, A.M. et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 22:1439-1441, 2003



Bloques constructivos modificadores trifuncionales

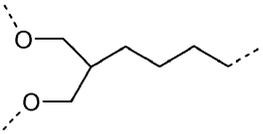
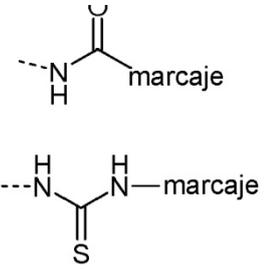
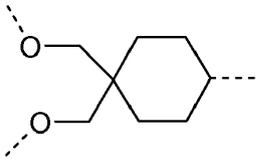
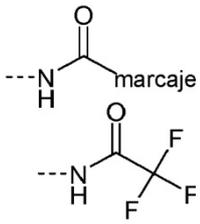
Los bloques constructivos trifuncionales conectan (i) una fracción funcional o, en caso necesario, una fracción funcional protegida, (ii) un grupo fosforamídita para el acoplamiento del informador o la fracción funcional o, en caso necesario, una fracción funcional protegida, durante la síntesis de oligonucleótidos a un grupo hidroxilo de la cadena oligonucleotídica en crecimiento, e (iii) un grupo hidroxilo que está protegido con un grupo protector lábil frente a ácidos preferentemente con un grupo protector dimetoxitritilo. Tras la eliminación de dicho grupo protector lábil a ácidos se libera un grupo hidroxilo que puede reaccionar con fosforamidas adicionales. Por lo tanto, los bloques constructivos trifuncionales permiten el posicionamiento de una fracción funcional en cualquier localización dentro de un oligonucleótido. Los bloques constructivos trifuncionales también son un requisito previo para la síntesis utilizando soportes sólidos, por ejemplo el vidrio de poro controlado (VPC), que se utilizan para el marcaje 3'-terminal de oligonucleótidos. En este caso, se conecta el bloque constructivo trifuncional con una fracción funcional o, en caso necesario, una fracción funcional protegida mediante cadenas de carbono alquilo, alqueno o alquínico C₂-C₁₈, mientras que dichas cadenas alquilo, alqueno o alquínico pueden encontrarse interrumpidas por fracciones etilenoxi y/o amida adicionales con el fin de incrementar la hidrofiliidad del espaciador y de esta manera de la estructura del conector completo y comprende un grupo hidroxilo que se encuentra unido mediante un espaciador cortable a una fase sólida y un grupo hidroxilo que se encuentra protegido con un grupo protector lábil a ácidos. Tras la eliminación de dicho grupo protector se libera un grupo hidroxilo que seguidamente puede reaccionar con una fosforamídita.

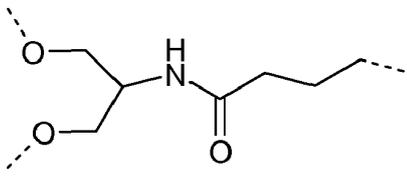
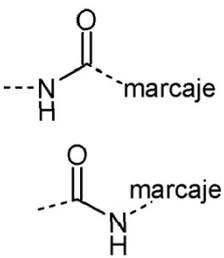
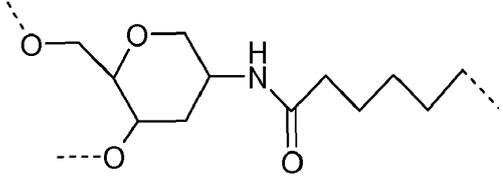
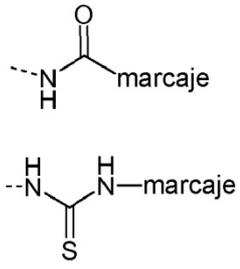
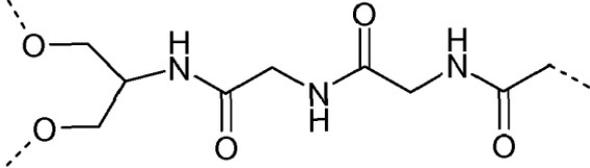
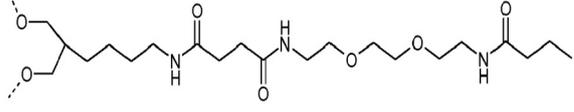
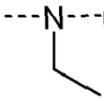
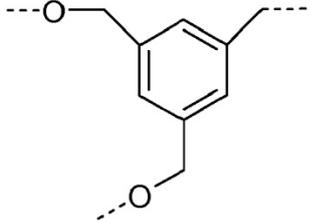
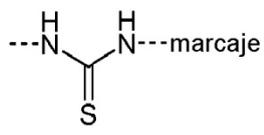
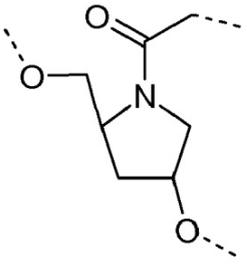
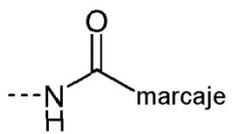
Los bloques constructivos trifuncionales pueden ser no nucleosídicos o nucleosídicos.

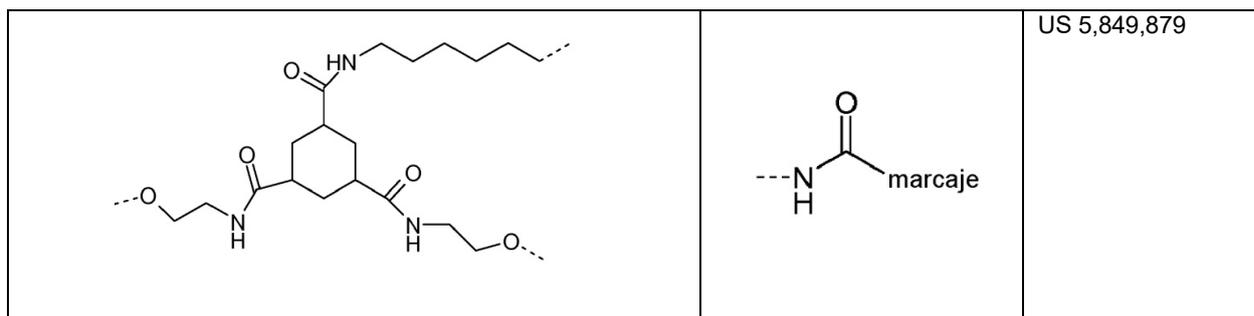
Los bloques constructivos trifuncionales no nucleosídicos son cadenas de carbonos alquilo, alqueno o alquínico C₂-C₁₈, mientras que dichas cadenas alquilo, alqueno o alquínico pueden interrumpirse opcionalmente con fracciones etilenoxi y/o amida adicionales con el fin de incrementar la hidrofiliidad del espaciador y de esta manera la estructura completa del conector. Otros bloques constructivos trifuncionales son grupos cíclicos como cicloalquilo C₅-C₆, C₄N, C₅N, C₄O, C₅O heterocicloalquilo, fenilo que se encuentran sustituidos opcionalmente con uno o más grupos alquilo C₁-C₆. Los grupos cíclicos y acíclicos pueden sustituirse con un grupo -alquilo C₁-C₁₈-O-PG, mientras que dicho alquilo C₁-C₁₈ comprende fracciones (etilenoxi)_n, (amida)_m, en donde n y m, independientemente, son iguales a 0 a 6 y PG es un grupo protector lábil a ácidos. Los bloques constructivos trifuncionales preferentes son alquilo C₃-C₆, cicloalquilo, fracciones heterocicloalquilo C₅O que comprenden opcionalmente un enlace amida y sustituidos con un grupo alquilo C₁-C₆-O-PG, en el que PG es un grupo protector lábil a ácidos, preferentemente monometoxitritilo, dimetoxitritilo, pixilo, xantilo, más preferentemente dimetoxitritilo.

Se resumen, por ejemplo, en la Tabla IV ejemplos no limitativos aunque preferentes de bloques constructivos trifuncionales no nucleosídicos.

Tabla IV: ejemplos de bloques constructivos modificadores trifuncionales no nucleosídicos

Trifuncional	Introducción de	Referencia
		Nelson, P.S. et al., Nucleic Acids Research 20:6253- 6259, 1992. EP 0 313 219; US 5,585,481; US 5,451,463; EP 0 786 468; WO 92/11388; WO 89/02439
		Su, S.-H. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7:1639-1644, 1997 WO 97/43451

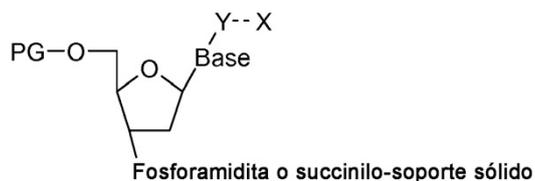
	<p>---O---marcaje</p> 	<p>Putnam, W.C. et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 24:1309-1323, 2005 US 2005/214833; EP 1 186 613</p>
		<p>EP 1 431 298</p>
	<p>H-N-C(=O)-O-Colesterol</p>	<p>WO 94/04550 Huynh, V. et al., Nucleic Acids Symposium Series 29 (Second International Symposium on Nucleic Acids Chemistry):19-20, 1993.</p>
	<p>---N---marcaje</p> 	<p>WO 2003/019145</p>
	<p>---N---marcaje</p> 	<p>Behrens, C. and Dahl, O., Nucleosides & Nucleotides 18 (1999) 291-305 WO 97/05156</p>
	<p>---N---marcaje</p> 	<p>Prokhorenko, I.A. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 5 (1995) 2081-2084 WO 2003/104249</p>



Bloques constructivos modificadores nucleosídicos:

Se utilizan bloques constructivos modificadores nucleosídicos para el marcaje interno siempre que resulte necesario no influir sobre las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos en comparación con un oligonucleótido no modificado. Por lo tanto, los bloques constructivos nucleosídicos comprenden una base o un análogo de base que todavía es capaz de hibridarse con una base complementaria. La fórmula general de un compuesto de marcaje para el marcaje de una secuencia de ácidos nucleicos de uno o más de entre a, a', b, b' o S comprendido en un agente ligante según la fórmula I de la presente invención se proporciona en la fórmula II.

Fórmula II:

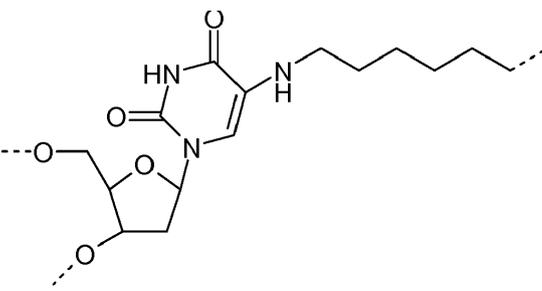
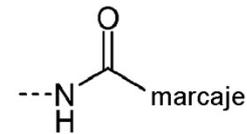


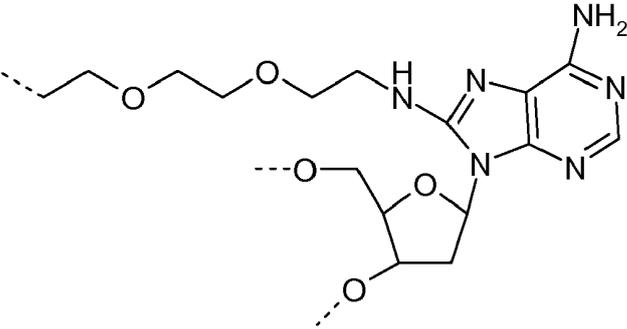
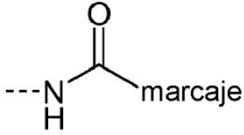
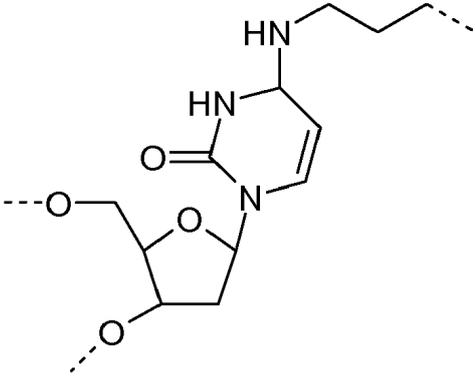
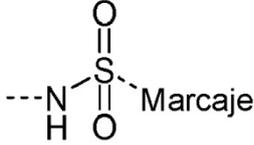
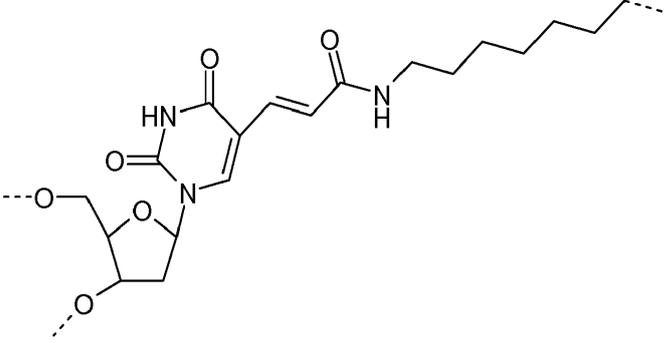
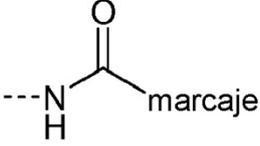
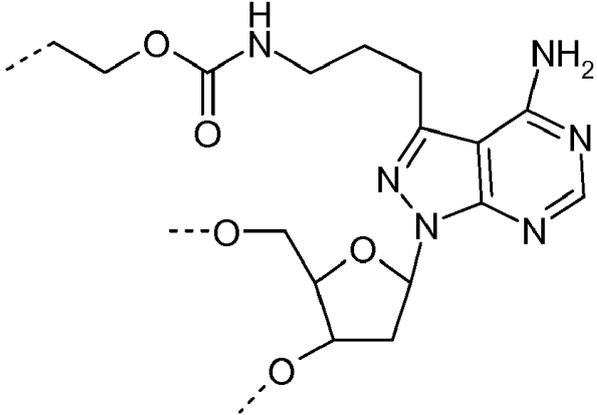
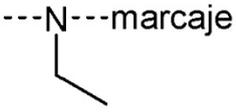
en la que PG es un grupo protector lábil a los ácidos, preferentemente monometoxitritilo, dimetoxitritilo, pixilo, xantilo, más preferentemente dimetoxitritilo, en el que Y es alquilo, alquenilo o alquinilo C₂-C₁₈, en el que dicho alquilo, alquenilo o alquinilo puede comprender fracciones etilenoxi y/o amida, en las que Y preferentemente es alquilo, alquenilo o alquinilo C₄-C₁₈ y contiene una fracción amida y en la que X es una fracción funcional a la que puede unirse un marcaje.

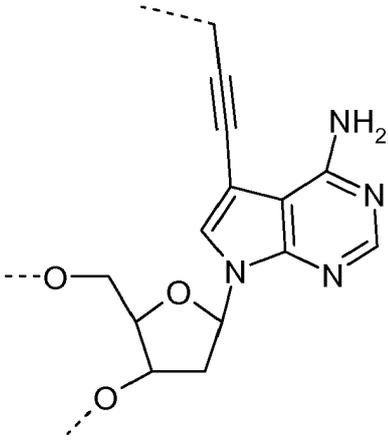
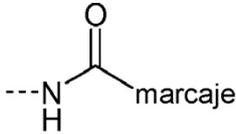
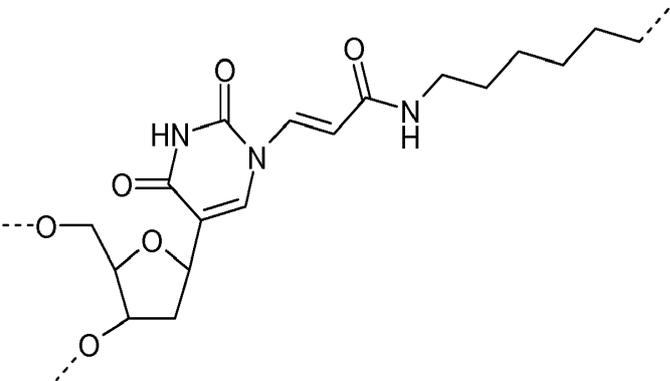
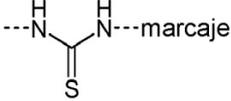
Las posiciones específicas de la base pueden seleccionarse para dicha sustitución con el fin de minimizar la influencia sobre las propiedades de hibridación. Por lo tanto, las posiciones siguientes resultan preferentes para la sustitución: a) con bases naturales: uracilo sustituido en C5; citosina sustituida en C5 o en N4; adenina sustituida en C8 o en N6 y guanina sustituida en C8 o en N2, y b) con análogos de base: 7-deaza-A y 7-deaza-G sustituido en C7; 7-deaza-8-aza-A y 7-deaza-8-aza-G sustituido en C7; 7-deaza-aza-2-amino A sustituido en C7; pseudouridina sustituida en N1 y formicina sustituida en N2.

Se proporcionan en la Tabla V ejemplos no limitativos aunque preferentes de bloques constructivos trifuncionales nucleosídicos.

Tabla V:

Nucleósido trifuncional	A	Referencia
		<p>Roget, A. et al., Nucleic Acids Research 17:7643-7651, 1989 WO 89/12642; WO 90/08156; WO 93/05060</p>

		<p>Silva, J.A. et al., Biotecnologia Aplicada 15:154-158, 1998</p>
		<p>US 6.531.581 EP 0 423 839</p>
		<p>US 4.948.882, US 5.541.313, US 5.817.786</p>
		<p>WO 2001/042505</p>

		McKeen, C.M. et al., <i>Organic & Biomolecular Chemistry</i> 1:2267-2275, 2003
		Ramzaeva N. et al., <i>Helvetica Chimica Acta</i> 83:1108-1126, 2000

5 En las Tablas III, IV y V, uno de los átomos de oxígeno terminales de una fracción bifuncional o uno de los átomos de oxígeno terminales de una fracción trifuncional es parte de una fosforamidita que no se muestra en detalle completo aunque resultará evidente para el experto en la materia. El segundo oxígeno de oxígeno terminal del bloque constructivo trifuncional se encuentra protegido con un grupo protector lábil a ácidos PG, tal como se ha definido para la fórmula II, anteriormente.

10 La modificación post-sintética es otra estrategia para introducir una fracción funcional unida covalentemente en un conector o en una molécula espaciadora. En este enfoque, se introduce un grupo amino mediante la utilización de un bloque constructivo bifuncional o trifuncional durante la síntesis en fase sólida. Tras la escisión del soporte y la purificación del oligonucleótido modificado amino, se hace reaccionar con un éster activado de una fracción funcional o con un reactivo bifuncional en el que un grupo funcional es un éster activo. Los ésteres activos preferentes son ésteres de NHS o fenil-ésteres de pentaflúor.

15 La modificación post-sintética resulta especialmente útil para introducir una fracción funcional que no sea estable durante la síntesis en fase sólida y la desprotección. Son ejemplos la modificación con éster de trifenilfosfinocarboximetilo para la ligación de Staudinger (Wang C.C. et al., *Bioconjugate Chemistry* 14:697-701, 2003), la modificación con digoxigenina o para introducir un grupo maleimido utilizando sulfo SMCC disponible comercialmente.

20 La fracción funcional X en una realización se encuentra unida a por lo menos uno de entre a', a, b, b' o S mediante una pareja de unión adicional.

25 La pareja de unión adicional a la que puede encontrarse unida una fracción funcional X preferentemente es un dominio de cremallera de leucinas o un ácido nucleico hibridante. En el caso de que la fracción funcional X se encuentra unida a por lo menos uno de entre a', a, b, b' o S mediante un elemento adicional de pareja de unión, el elemento de pareja de unión al que se encuentra unido X y las parejas de unión a':a y b':b', respectivamente, se seleccionan todos para que presenten diferente especificidad. Las parejas de unión a':a' y b':b' y la pareja de unión a la que se encuentra unida X se unen (por ejemplo se hibridan), cada una, a su pareja respectiva sin interferir con la
30 unión de cualquiera de las otras parejas de unión.

Acoplamiento covalente de un elemento de una pareja de unión con un ligante monovalente

Dependiendo de la naturaleza bioquímica del ligante, se dispone de diferentes estrategias de conjugación.

5 En el caso de que el ligante sea una proteína natural o un polipéptido recombinante de entre 50 y 500 aminoácidos, existen procedimientos estándares en los libros de texto que describen las reacciones de síntesis de conjugados de proteínas que pueden ser fácilmente seguidas por el experto en la materia (Hackenberger C.P. y Schwarzer D., *Angew Chem., Int. Ed.*, 47:10030-10074, 2008).

10 En una realización, se utiliza la reacción de una fracción maleinimido con un residuo de cisteína dentro de la proteína. Ésta es una reacción de acoplamiento preferente, en el caso de que se utilice, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab' de un anticuerpo, un ligante monovalente. Alternativamente, en una realización se lleva a cabo el acoplamiento de un elemento de una pareja de unión (a' o b', respectivamente, de la fórmula I) con el extremo C-terminal del polipéptido ligante. La modificación C-terminal de una proteína, por ejemplo de un fragmento Fab, puede llevarse a cabo, por ejemplo, tal como indican Sunbul M. et al., *Organic & Biomolecular Chemistry* 7:3361-3371, 2009).

En general, la reacción específica de sitio y el acoplamiento covalente de un elemento de una pareja de unión con un ligante polipeptídico monovalente se basa en transformar un aminoácido natural en un aminoácido con una reactividad que es ortogonal respecto a la reactividad de los otros grupos funcionales presentes en una proteína. Por ejemplo, una cisteína específica dentro de un contexto de secuencia raro puede convertirse enzimáticamente en un aldehído (ver Formylglycine aldehyde tag -protein engineering through a novel post-translational modification (Frese, M.-A. et al., *ChemBioChem* 10:425-427, 2009). También resulta posible obtener una modificación de aminoácido deseada mediante la utilización de la reactividad enzimática específica de determinados enzimas con un aminoácido natural en un contexto de secuencia dado (ver, por ejemplo, Taki M. et al., *Protein Engineering, Design & Selection* 17:119-126, 2004; Gautier A. et al., *Chemistry & Biology* 15:128-136, 2008; la formación de enlaces C-N catalizada por proteasas es utilizada por Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* 389-403, 2004) y la ligación de proteínas mediada por sortasa es utilizada por Mao H. et al., *J. Am Chem Soc.* 126:2670-2671, 2004 y revisada por Proft T., *Biotechnol. Lett* 32:1-10, 2010).

30 La reacción específica de sitio y el acoplamiento covalente de un elemento de pareja de unión a un ligante polipeptídico monovalente también puede llevarse a cabo mediante la reacción selectiva de aminoácidos terminales con reactivos modificados apropiados.

35 Puede utilizarse la reactividad de una cisteína N-terminal con benzonitrilos (Ren, Hongjun Xiao et al., *Angewandte Chemie, International Edition* 48:9658-9662, 2009) para conseguir un acoplamiento covalente específico de sitio.

La ligación química nativa también puede basarse en residuos de cisteína C-terminales (Taylor E. et al., *Nucleic Acids and Molecular Biology* 22:65-96, 2009).

40 La patente EP nº 1 074 563 describe un método de conjugación que se basa en la reacción más rápida de una cisteína dentro de un tramo de aminoácidos cargados negativamente con una cisteína situada en un tramo de aminoácidos cargados positivamente.

45 El ligante monovalente también puede ser un péptido sintético o mimético de péptido. En el caso de que se sintetice un péptido químicamente, pueden incorporarse aminoácidos con reactividad química ortogonal durante dicha síntesis (de Graaf A.J. et al., *Bioconjugate Chemistry* 20:1281-1295, 2009). Debido a que se encuentra incluida una gran diversidad de grupos funcionales ortogonales que pueden ser introducidos en un péptido sintético, la conjugación de dicho péptido con un conector es una reacción estándar.

50 Con el fin de obtener una proteína con un solo marcaje, el conjugado con estequiometría 1:1 puede separarse mediante cromatografía de otros productos de conjugación. Dicho procedimiento resulta facilitado por la utilización de un elemento de pareja de unión marcado con pigmento y un espaciador con carga. Mediante la utilización de este tipo de elemento de pareja de unión marcado y con elevada carga negativa, se separan con facilidad proteínas mono-conjugados de las proteínas no marcadas y de las proteínas que portan más de un conector, ya que puede utilizarse para la separación las diferencias de carga y peso molecular. El pigmento fluorescente resulta valioso para purificar el agente ligante bivalente de los componentes no unidos, tales como un ligante monovalente marcado.

55 Por lo tanto, en una realización resulta preferente utilizar un elemento de pareja de unión (a' y/o b', respectivamente, de fórmula I) que se encuentra marcado con un pigmento fluorescente (por ejemplo sintetizado utilizando un bloque constructivo modificador bifuncional o trifuncional en combinación con bloques constructivos espaciadores bifuncionales durante la síntesis) para formar el agente ligante bivalente de la presente invención. En una realización preferente, el espaciador S, así como las secuencias a, a', b y b' son de ADN y por lo menos una de entre a' y b', respectivamente, se marca con un pigmento fluorescente. En una realización preferente, el espaciador S, así como las secuencias a, a', b y b' son de ADN y tanto a' como b', respectivamente, se encuentran marcadas, cada una, con un pigmento fluorescente diferente.

En una realización, se da a conocer un método para producir un agente ligante bivalente que se une específicamente a un polipéptido diana modificado post-traduccionalmente. El método comprende las etapas siguientes: (a) seleccionar un primer ligante monovalente que se une a un epítipo de polipéptido de dicho polipéptido diana con una K_{dis} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, (b) seleccionar un segundo ligante monovalente que se une a una modificación de polipéptido post-traducciona con una K_{dis} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, c) acoplar ambos ligantes monovalentes con un conector, y (d) seleccionar un agente ligante bivalente que presenta un valor de K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior.

Tal como apreciará el experto en la materia, la K_{dis} es un valor dependiente de la temperatura. Lógicamente el valor de K_{dis} de ambos ligantes monovalentes, así como del agente ligante bivalente según la presente invención se determinan a la misma temperatura. Tal como se apreciará, preferentemente se determina un valor de K_{dis} a la misma temperatura a la que debe utilizarse el agente ligante bivalente, por ejemplo se lleva a cabo un ensayo. En una realización, los valores de K_{dis} se establecen a temperatura ambiente, es decir, a 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C o 25°C. En una realización, los valores de K_{dis} se establecen a 4°C o a 8°C. En una realización, se establecen los valores de K_{dis} a 25°C. En una realización, se establecen los valores de K_{dis} a 37°C. En una realización, se establecen los valores de K_{dis} a 40°C. En una realización preferente, las determinaciones de la K_{dis} , es decir, las de cada ligante monovalente y la determinación de la K_{dis} del ligante dual, se realizan a 37°C.

Utilizando un método tal como se da a conocer en la presente invención, ahora resulta bastante fácil producir diversos agentes ligantes bivalentes, comprendiendo cada uno un conector de diferente longitud y seleccionar aquellos agentes ligantes bivalentes que presentan las propiedades de unión deseadas, es decir, un valor de K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior. La selección de un agente ligante bivalente con la K_{dis} deseada se lleva a cabo mediante análisis Biacore™ tal como se da a conocer en el Ejemplo 2.8.

En una realización, la presente invención se refiere a un método de formación de un agente ligante bivalente según la presente invención, en el que un primer ligante monovalente A seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo de polipéptido de un polipéptido diana con una K_{dis} de entre $10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$ que se acopla con un elemento de una primera pareja de unión a', formando de esta manera A-a', en donde - representa un enlace covalente, un segundo ligante monovalente B seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal que se une a una fosforilación post-traducciona del polipéptido con una K_{dis} de entre $10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$ que se acopla con un elemento de una segunda pareja de unión b', formando de esta manera b'-B, en donde - representa un enlace covalente, en el que la primera y la segunda parejas de unión no interfieren una con otra y un conector que comprende un espaciador S y el elemento de pareja de unión complementario al elemento del primer y segundo elemento de pareja de unión, a y b respectivamente, se coincuban, en donde se forma un agente ligante bivalente con un valor de K_{dis} de $10^{-5}/s$ o inferior, en el que a:a' y b:b' son parejas de unión que consisten de secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, formando cada una un dúplex estable mediante apareamiento de múltiples bases, en el que las secuencias de la pareja de unión a':a no se unen a las secuencias de la pareja de unión b:b', respectivamente, y viceversa, y en el que a y b se unen mediante un espaciador S, formando de esta manera un conector a-S-B, en el que - representa un enlace covalente, presentando el conector una longitud de entre 10 y 50 nm.

En una realización, el método anteriormente indicado comprende además la etapa de aislar el agente ligante bivalente.

La estequiometría preferente para ensamblar el agente ligante bivalente según la presente invención es 1:1:1.

En una realización preferente, el método para producir un reactivo ligante bivalente según la presente invención utiliza un conector de L-ADN. En una realización preferente, el método para producir un reactivo ligante bivalente según la presente invención utiliza dos parejas de unión específicas que consisten de ADN, preferentemente L-ADN y de un conector de L-ADN.

La formación y la estequiometría del agente ligante bivalente formado puede analizarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño según procedimientos del estado de la técnica. Si se desea, los complejos formados también pueden analizarse mediante SDS-PAGE.

El agente ligante bivalente dado a conocer en la presente invención, en caso de utilizarse en un procedimiento de tinción inmunohistoquímica sólo se une significativamente y no se desprende en el lavado durante las diversas etapas de incubación de dicho procedimiento en el caso de que presente una K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o mejor. Dicha K_{dis} sólo puede alcanzarse en el caso de que ambos ligantes monovalentes se unan a su sitio de unión correspondiente. En el caso de que sólo se encuentre presente el epítipo de polipéptido o únicamente una modificación post-traducciona sobre una molécula en la muestra, no se observará tinción significativa. De esta manera, y esto resulta muy ventajoso, la tinción inmunohistoquímica sólo se observará en el caso de que el polipéptido diana modificado post-traduccionalmente, que porta la modificación relevante, se encuentre presente en la muestra.

Por lo tanto, en una realización preferente, la presente invención se refiere a un método de tinción histológica,

comprendiendo el método las etapas de: (a) obtener una muestra de células o tejido, (b) incubar dicha muestra con un agente ligante bivalente de fórmula I:



5 capaz de unión a un polipéptido diana fosforilado post-traduccionamente, comprendiendo el agente ligante bivalente exactamente dos ligantes monovalentes A y B de diferente especificidad que se unen entre sí mediante un conector, en el que a) - representa un enlace covalente, b) a-S-b es un conector que presenta una longitud de entre 10 y 50 nm, en el que S es un espaciador, c) a':a y b:b' son parejas de unión que consisten de secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, formando cada una un dúplex estable mediante apareamiento de múltiples bases, en el que las secuencias de la pareja de unión a':a no se unen a las secuencias de la pareja de unión b:b', respectivamente, y viceversa, d) el primer ligante monovalente A es una molécula que interactúa con el polipéptido diana en un único sitio de unión, en el que el primer ligante monovalente se une a un epítipo de polipéptido de dicho polipéptido diana, y en el que el epítipo de polipéptido no se ha sometido a una modificación post-traduccionales, e) el segundo ligante monovalente B se unen a una fosforilación post-traduccionales, en el que la K_{dis} del segundo ligante monovalente es por lo menos 20 veces inferior para un polipéptido que porta la fosforilación post-traduccionales en comparación con el mismo polipéptido no fosforilado post-traduccionales, f) cada ligante monovalente se selecciona de entre el grupo que consiste de un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal, g) cada ligante monovalente presenta una K_{dis} en el intervalo de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, determinado mediante espectroscopia de resonancia del plasmón superficial basado en biosensor, y h) el agente ligante bivalente presenta una K_{dis} de $3 \times 10^{-5}/s$ o inferior, determinada mediante espectroscopia de resonancia del plasmón superficial basada en biosensor, y (c) detectar el agente ligante bivalente, tiñendo de esta manera dicha muestra para un polipéptido diana fosforilado post-traduccionales.

25 La utilización de un agente ligante bivalente según la presente invención en la tinción de una muestra de células o tejido mediante un método inmunohistoquímico representa una realización preferente adicional.

En términos más generales, la presente invención se refiere a un agente ligante bivalente de fórmula I:



30 capaz de unión a un polipéptido diana fosforilado post-traduccionales, comprendiendo el agente ligante bivalente exactamente dos ligantes monovalentes A y B de diferente especificidad que se unen entre sí mediante un conector, en el que a) - representa un enlace covalente, b) a-S-b es un conector que presenta una longitud de entre 10 y 50 nm, en el que S es un espaciador, c) a':a y b:b' son parejas de unión que consisten de secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, formando cada una un dúplex estable mediante apareamiento de múltiples bases, en el que las secuencias de la pareja de unión a':a no se unen a las secuencias de la pareja de unión b:b', respectivamente, y viceversa, d) el primer ligante monovalente A es una molécula que interactúa con el polipéptido diana en un único sitio de unión, en el que el primer ligante monovalente se une a un epítipo de polipéptido de dicho polipéptido diana, y en el que el epítipo de polipéptido no se ha sometido a una modificación post-traduccionales, e) el segundo ligante monovalente B se unen a una fosforilación post-traduccionales, en el que la K_{dis} del segundo ligante monovalente es por lo menos 20 veces inferior para un polipéptido que porta la fosforilación post-traduccionales en comparación con el mismo polipéptido no fosforilado post-traduccionales, f) cada ligante monovalente se selecciona de entre el grupo que consiste de un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal, g) cada ligante monovalente presenta una K_{dis} en el intervalo de entre $5 \times 10^{-3}/s$ y $10^{-4}/s$, determinado mediante espectroscopia de resonancia del plasmón superficial basado en biosensor, uniéndose dicho agente ligante a un polipéptido diana modificado post-traduccionales con una K_{dis} que satisface los requisitos de un sistema de ensayo (automatizado) o los supera, en el que (i) el primer ligante monovalente que se une a un epítipo de polipéptido de dicho polipéptido diana con una K_{dis} por lo menos 10 veces superior a los requisitos del sistema de ensayo (automatizado), (ii) el segundo ligante monovalente que se une a una modificación de polipéptido post-traduccionales con una K_{dis} por lo menos 10 veces superior a los requisitos del sistema de ensayo (automatizado) e (ii) en el que el producto de los valores de K_{dis} de los dos ligantes monovalentes (i) e (ii) es por lo menos la K_{dis} requerida por el sistema (automatizado) o menos.

55 En términos generales, se describe un método para obtener un agente ligante bivalente que se une específicamente a un polipéptido diana modificado post-traduccionales con una K_{dis} que satisface por lo menos los requisitos de ensayo mínimos de un sistema de ensayo (automatizado) o los supera, comprendiendo el método las etapas de: (a) seleccionar un primer ligante monovalente que se une a un epítipo no modificado post-traduccionales de dicho polipéptido diana con una K_{dis} por lo menos 10 veces superior a los requisitos de ensayo mínimos del sistema de ensayo (automatizado), (b) seleccionar un segundo ligante monovalente que se une a una modificación de polipéptido post-traduccionales con una K_{dis} por lo menos 10 veces superior a los requisitos de ensayo mínimos del sistema de ensayo (automatizado), en el que el producto de los valores de K_{dis} de los dos ligantes monovalentes en las etapas (a) y (b) es por lo menos la K_{dis} requerida por el sistema (automatizado) o inferior y (c) acoplar ambos ligantes monovalentes mediante un conector.

65

En una realización, el sistema automatizado es el analizador Benchmark® distribuido por Ventana Medical Systems Inc., Tucson.

5 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

10 Descripción del listado de secuencias

1. Fragmentos de anticuerpo

SEC ID nº 1 V_H (mAb 1.4.168):

QCDVKLVESG GGLVKPGGSL KLSCAASGFT FSDYPMSWVR QTPEKRLEWV
 ATITTTGGTYT YYPDSIKGRF TISRDNKNT LYLQMGSLQS EDAAMYYCTR
 15 VKTDLWWGLA YWQGTLLVTV SA

SEC ID nº 2 V_L (mAb 1.4.168):

QLVLTQSSSA SFSLGASAKL TCTLSSQHST YTIEWYQQQP LKPPKYVMEL
 KKDGSHTTGD GIPDRFSGSS SGADRYLSIS NIQPEDESIY ICGVGDTIKE
 20 QFVYVFGGGT KVTVLG

SEC ID nº 3 V_H (mAb 8.1.2):

EVQLQQSGPA LVKPGASVKM SCKASGFTFT SYVIHWVKQK PGQGLEWIGY
 LNPYNDNTKY NEKFKGKATL TSDRSSSTVY MEFSSLTSED SAVYFCARRG
 25 IYAYDHYFDY WGQGTSLTVS S

SEC ID nº 4 V_L (mAb 8.1.2):

QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCASASSVN YMYWYQQKPG SSPRLLIYDT
 SNLASGVPVR FSGSGSVTSY SLTISRMEAE DAATYYCQW STYPLTFGAG
 30 TKLELK

SEC ID nº 19 V_H (mAb 30.4.33):

EVQLQESGPE VAKPGASVKM SCKASGYTFT DYIIHWVKQR PGQDLEWIGY
 INPYNDKSKY NEKFKDKATL TSDRSSSTSY MDLSTLTSDD SAVYYCTRHG
 35 YYRSDGFDYW GQGTTLTVSS

SEC ID nº 20 V_L (mAb 30.4.33):

DIVLTQSPTI MSASPGEKVT MTCRASSSVS SSSLHWYQQK PGSSPKLWIY
 STSTLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISGVE TEDAATYYCQ QYGTSPYTFG
 40 SGTKVDIK

SEC ID nº 21 V_H (mAb 7.2.32):

EFEVQLQESG GGLVQPKGSL QLSCAASGFT FNTYAMHWVR QAPGKGLEWV
 ARIRTESSDY ATDYADSVKD RFIISRDDSQ NMLYLQMNLL KSEDTAIYYC
 45 VRSSGFDYWG QGTTLTVSSS

SEC ID nº 22 V_L (mAb 7.2.32):

DIQMTQSPSL PVSLGDQASI SCRSSQSLVH DNGNTYLHWF LQKPGQSPKL
LIYKVSNRFS GVPDRFGGSG SGTDFTLKIS GVEAEDLGVY FCSQGTHVPT
FGGGTKLEIK

5 SEC ID nº 23 V_H (mAb 4.1.15):

EFEVQLQESG PELVKPGTSV TISCKTSGYA FSNSWMSWVK QRPQGGLLEWI
GRIFPGNGDT DYNGNFRAKA TLTADKSSST AFMQLSRLTS VDSAVYFCAR
SRGLRQGAGF AYWGQGTLLVT VSA

10 SEC ID nº 24 V_L (mAb 4.1.15):

DIVMTQSPSS LAMSVGQKAT MSCKSSQSLL NSSTQRNYLA WYQQKPGQSP
KLLVYFASTR ESGVPDRFIG SGS GTDFTLT ISSVQAEDLA AYFCQQHYSN
PRTFGGGTKL EIK

2. Secuencias de ADNss

15 a) ADNss 19-mero (unido covalentemente en el extremo 3' con Fab' del mAb b anti-troponina-T o Fab' 8.1.2 con IGF-1R fosforilado, respectivamente)

5'-A GTC TAT TAA TGC TTC TGC-3' (SEC ID nº 5)

20 b) ADNss 17-mero (unido covalentemente en el extremo 5' con Fab' del mAb a anti-troponina-T o Fab' 1.4.168 con IGF-1R, respectivamente)

5'-AGT TCT ATC GTC GTC CA-3' (SEC ID nº 6)

25 c) ADNss 19-mero complementario (utilizado como parte de un conector)

5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-3' (SEC ID nº 7)

30 d) ADNss 17-mero complementario (utilizado como parte de un conector)

5'- TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' (SEC ID nº 8)

3. Secuencias de epítomos de troponina T:

35 SEC ID nº 9 = ERAEQQRIRAEREKEUUSLKDRIEKRRRAERAEamida, en la que U representa β-Alanina. (el epítomo "A" para el anticuerpo anti-troponina a.)

SEC ID nº 10 = SLKDRIERRAERAEEOERAEQQRIRAEREKEamida, en el que O representa ácido amino-
trioxo-octanoico. (el epítomo "B" para el anticuerpo anti-troponina b.)

40

4. Secuencias de los epítomos de IGF-1R/1R

SEC ID nº 11 = FDERQPYAHMNGGRKNERALPLQSST; IGF-1R (1340-1366)

45 SEC ID nº 12 = YEEHIPYTHMNGGKKNRILTLPRSNPS; hIR(1355-1382)

5. Conector proteico y secuencias de etiqueta:

50 SEC ID nº 13 = motivo GGGGS (=G4S) (por ejemplo como parte de un polipéptido conector)

SEC ID nº 14 = YPYDVPDYA (etiqueta HA)

SEC ID nº 15 = GLNDIFEAQKIEWHE (etiqueta Avi)

55 SEC ID nº 16 = LPETGGGSGS (etiqueta de corte de sortasa)

6. Secuencias de epítomos de HER3:

SEC ID nº 17 = PLHPVPIMPTAGTTPDEDYEYMNQR; hHER3 (1242-1267)

5 SEC ID nº 18 = PASEQGYEEMRAF; hHER3 (1283-1295)

7. Secuencias de ADNmm para el marcaje de Fab mediado por sortasa

10 SEC ID nº 25 = 5'-(Gly₂)-conector amino-(espaciador C3)3-AGT TCT ATC GTC GTC CA-Fluoresceína-3'
(oligo 17-mero)

SEC ID nº 26 = 5'-Fluoresceína-AGT CTA TTA ATG CTT CTG C-(espaciador C3)3-conector amino-'-(Gly)₂-3'
(oligo 19-mero)

15 Descripción de las figuras

Figura 1: experimentos de filtración en gel analítica que evalúa la eficiencia del ensamblaje de ligante dual anti-pIGF1-R. Los diagramas a, b y c muestran el perfil de elución de los componentes individuales del ligante dual (fluoresceína-Fab_{ss'} 1.4.168, Cy5-Fab_{ss'} 8.1.2 y ADN conector (T=0); Fab_{ss'} se refiere a un fragmento Fab conjugado con un oligonucleótido de cadena sencilla). El diagrama 'd' muestra el perfil de elución tras mezclar los 3 componentes necesarios para formar el agente ligante bivalente en una proporción molar 1:1:1. La curva más gruesa (fondo) representa la absorbancia medida a 280 nm, que indica la presencia de las proteínas Fab_{ss'} o del ADN conector, respectivamente. La curva en la parte superior más delgada en b) y d) (absorbancia a 495 nm) indica la presencia de fluoresceína y la curva en la parte superior más delgada en a) y la curva en la parte intermedia en d) (absorbancia a 635 nm) indican la presencia de Cy5. La comparación de los volúmenes de elución de los componentes individuales del ligante dual (VE_{Fab_{ss'} 1.4.168} ~15 ml; VE_{Fab_{ss'} 8.1.2} ~15 ml; VE_{conector} ~16 ml) con el volumen de elución de la mezcla de reacción (VE_{mezcla} ~12 ml) demuestran que la reacción de ensamblaje del ligante dual tuvo éxito (tasa de rendimiento: ~90%). El pico principal a 280 nm que representa el ligante dual eluido se solapa perfectamente con los picos principales en los canales 495 nm y 635 nm, demostrando la presencia de tanto Fab_{ss'} 8.1.2 como Fab_{ss'} 1.4.168 en el pico que representa el agente ligante bivalente.

Figura 2: esquema del experimento BIAcore™. A modo de esquema y ejemplo se muestran dos moléculas de unión en solución: El agente ligante bivalente T0-T-Dig (conector 16) y el agente ligante bivalente T40-T-Dig (conector 15). Los dos agentes ligantes bivalentes sólo difieren en la longitud del conector (una T digoxigenilada central sin T adicional frente a 40 T adicionales (20 en cada lado del T-Dig central) entre las dos secuencias de ácidos nucleicos hibridantes). Además, se utilizaron los fragmentos Fab_{ss'} 8.1.2 y 1.4.168.

Figura 3: sensograma de Biacore™ con gráfico de superposición de tres cinéticas que muestra la interacción del agente ligante bivalente a 100 nM (que consiste de Fab_{ss'} 8.1.2 y Fab_{ss'} 1.4.168 hibridado con conector de ADNss T40-T-Dig, es decir, el conector 15) con el péptido pIGF-1R inmovilizado, en comparación con las características de unión de Fab_{ss'} 1.4.168 100 nM o Fab_{ss'} 8.1.2 100 nM al mismo péptido. Se obtuvo el rendimiento de unión más alto con el constructo de ligante dual, demostrando claramente que el efecto de unión cooperativa del ligante dual se incrementa la afinidad para el péptido diana pIGF-1R.

Figura 4: sensograma de Biacore™ con gráfico de superposición de tres cinéticas que muestra las interacciones del agente ligante bivalente que consiste de Fab_{ss'} 8.1.2 y Fab_{ss'} 1.4.168 hibridado con el conector de ADNss T40-T-Dig, es decir, el conector 15, con el péptido pIGF-1R inmovilizado (IGF-1R fosforilado), IGF-1R o pRI (receptor de insulina fosforilado). Se obtuvo el rendimiento de unión más alto con el péptido pIGF-1R, demostrando claramente que el efecto de unión cooperativa del ligante dual incrementa la especificidad para el péptido diana pIGF-1R en comparación con, por ejemplo, el péptido receptor de insulina (pRI) fosforilado.

Figura 5: sensograma de Biacore™ con gráfico de superposición de dos cinéticas que muestra las interacciones del agente ligante que consiste de Fab_{ss'} 8.1.2 y Fab_{ss'} 1.4.168 hibridado con el conector de ADNss T40-T-Dig, es decir, el conector 15, y una mezcla de Fab_{ss'} 1.4.168 100 nM o Fab_{ss'} 8.1.2 100 nM sin ADN conector. El mejor rendimiento de unión sólo se obtiene con el agente ligante bivalente, mientras que la mezcla de los Fab_{ss'} sin conector no muestra un efecto de unión cooperativa observable, a pesar del hecho de que la concentración total de estos Fab_{ss'} había sido 200 nM.

Figura 6: dibujo esquemático de un ensayo de tipo sándwich Biacore™. Este ensayo se ha utilizado para investigar la accesibilidad de los epítomos para ambos anticuerpos en el péptido IGF-1R fosforilado.

<MlgGFcy>R presenta un anticuerpo de conejo antiratón utilizado para capturar el anticuerpo murino M-1.4.168. A continuación, se utiliza M-1.4.168 para capturar el péptido pIGF-1R. M-8.1.2 finalmente forma el sándwich que consiste de M-1.4.168, el péptido y M-8.1.2.

- 5 Figura 7: sensograma de Biacore™ que muestra la señal de unión (línea gruesa) del anticuerpo secundario 8.1.2 al péptido pIGF-1R después de ser capturado por el anticuerpo 1.4.168 sobre el chip Biacore™. Las otras señales (líneas delgadas) son señales de control: se proporcionan las líneas de parte superior a inferior: 8.1.2 500 nM, 1.4.168 500 nM, anticuerpo no relacionado con diana IgG-M33 <CKMM> 500 nM y anticuerpo de control no relacionado con diana IgG-M-1.20<TSH>, respectivamente. No pudo detectarse ningún suceso de unión en ninguno de dichos controles.
- 10
- 15 Figura 8: dibujo esquemático del ensayo Biacore™, que presentan los ligantes duales biotinilados sobre la superficie del sensor. En la celda de flujo 1 (=CF1) (no mostrada) se capturó amino-PEO-biotina. En CF2, CF3 y CF4 se inmovilizaron agentes ligantes bivalentes con longitud de conector creciente (se muestran los ligantes duales en CF2 (T0-bi=sólo un T-Bi central) y CF4 (T40-b8=un T-Bi central y 20 T cada uno, cadena arriba y cadena abajo, respectivamente). Analito 1: péptido IGF-1R que contiene el epítipo Fab_ss' M-1.4.168 a la derecha del péptido (línea superior) - el fosfoepítipo Fab_ss' M-8.1.2 no se encuentra presente, debido a que dicho péptido no está fosforilado; analito 2: péptido pIGF-1R que contiene el fosfoepítipo Fab_ss' M-8.1.2 (P) y el epítipo Fab_ss' M-1.4.168 (segunda línea); analito 3: péptido pRI, que contiene el fosfoepítipo Fab_ss' M-8.1.2 de reacción cruzada pero no el epítipo para M-1.4.168 (tercera línea).
- 20
- 25 Figura 9: datos cinéticos del experimento de ligante dual. ligante dual de conector T40-T-Bi con Fab_ss' 8.1.2 y Fab_ss' 1.4.168 (=T40 en la figura) muestra una tasa de desprendimiento más baja ($k_d=2,97 \times 10^{-5}/s$) frente a pIGF-1R en comparación con pRI ($k_d=3,70 \times 10^{-2}/s$).
- 30 Figura 10: sensograma de Biacore™, que muestra la medición dependiente de la concentración del agente ligante dual T40-T-Bi frente al péptido pIGF-1R (el péptido IGF-1R fosforilado). La configuración del ensayo era la ilustrada en la fig. 8. Se inyectó una serie de concentración del péptido pIGF-1R a 30 nM, 10 nM, 2x 3,3 nM, 1,1 nM, 0,4 nM, 0 nM. Los datos correspondientes se proporcionan en la tabla de la fig. 9.
- 35 Figura 11: sensograma de Biacore™, que muestra la medición dependiente de la concentración del agente ligante dual T40-T-Bi frente al péptido IGF-1R (el péptido IGF-1R no fosforilado). La configuración del ensayo era la ilustrada en la fig. 8. Se inyectó una serie de concentración del péptido IGF-1R a 300 nM, 100 nM, 2x 33 nM, 11 nM, 4 nM, 0 nM. Los datos correspondientes se proporcionan en la tabla de la fig. 9.
- 40 Figura 12: sensograma de Biacore™, que muestra la medición dependiente de la concentración del agente ligante dual T40-T-Bi frente al péptido pRI (el péptido receptor de insulina fosforilado). La configuración del ensayo era la ilustrada en la fig. 8. Se inyectó una serie de concentración del péptido pRI a 100 nM, 2x 33 nM, 11 nM, 4 nM, 0 nM. Los datos correspondientes se proporcionan en la tabla de la fig. 9.
- 45 Figura 13 (A): experimento de transferencia western con lisados de células 3T3 que se utilizaron para la generación de pellets de células 3T3 fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFIP). Se sometieron 5 µg de proteínas totales de cada lisado a SDS-PAGE y transferencia western. La detección ocurrió con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Millipore, clon 4G10). El asterisco (*) o la pareja de asteriscos (**) indican la posición de las bandas de IGF-1R fosforilado o de proteínas RI fosforiladas. (B) Resultados de los experimentos de IHQ won pellets de células 3T3 FFIP. La molécula de detección compuesta de una molécula de conector 8xC18 (conector 14 del Ejemplo 2.4) y únicamente Fab_ss' 1.4.168 o únicamente Fab_ss' 30.4.33 no produjeron tinción en ninguno de los pellets de células 3T3 FFIP sometidos a ensayo (filas 1 y 2). En contraste, la detección con la molécula ligante dual completa (que consistía de ambos fragmentos Fab_ss' + conector 8xC18) condujo a tinción, pero sólo de las células sobreexpresantes de IGF-1R que fueron estimuladas con IGF-1 (fila 3). No se observó reactividad cruzada sobre células que sobreexpresaban RI ni siquiera al inducir la fosforilación de RI. (C) Experimento IHQ que compara el rendimiento de ligantes duales anti-pIGF-1R con diferente longitud de conector (conectores que contenían espaciadores 2xC18, 4xC18, 6xC18 o 8xC18; ver el Ejemplo 2.4) sobre células 3T3 FFIP sobreexpresantes de IGF-1R que habían sido estimuladas con IGF-1 para inducir la fosforilación de IGF-1R.
- 50
- 55
- 60
- 65 Figura 14: inmunotinción de secciones de xenoinjerto H322M. Para la detección se utilizaron 10 µg/ml por cada fragmento Fab_ss' (Fab_ss' 30.4.33 y/o Fab_ss' 1.4.168, respectivamente) y una cantidad equimolar de molécula conectora 8xC18. Un marcaje de biotina dentro de la molécula de detector sirvió como etiqueta de detección para el kit de detección iVIEW DAB de Ventana basado en estreptavidina.

- 5 Figura 15: dibujo esquemático del ensayo Biacore, que presentan los ligantes duales biotinilados sobre la superficie del sensor. Se inmovilizó una molécula de conector 8xC18 biotinilado que se utilizó para capturar Fab_{ss}' 1.4.168 y/o Fab_{ss}' 30.4.33, respectivamente. El analito era un péptido pIGF-1R que contenía el epítipo Fab_{ss} M-1.4.168 en un extremo del péptido y el fosfoepítipo Fab_{ss} M-30.43.3 en el otro extremo.
- 10 Figura 16: tabla que resumen los datos cinéticos del experimento de ligante dual. El ligante dual contenían tanto Fab_{ss}' 30.4.33 y Fab_{ss}' 1.4.168 muestra una tasa de desprendimiento 230 veces más baja ($k_d=1,39 \times 10^{-5}/s$) que Fab_{ss}' 1.4.168 ($k_d=3,22 \times 10^{-3}/s$) y una tasa de desprendimiento 110 veces más baja que Fab_{ss}' 30.4.33 ($k_d=1,57 \times 10^{-3}/s$) por sí solo.
- 15 Figura 17: sensograma de Biacore, que muestra la medición dependiente de la concentración de un agente ligante monovalente compuesto de una molécula de conector 8xC18 y Fab_{ss}' 30.4.33 frente al péptido IGF-1R fosforilado. La configuración del ensayo era la ilustrada en la fig. 15. Se inyectó una serie de concentración del péptido pIGF-1R fosforilado sintético de SEC ID nº 11 a 30 nM, 10 nM, 2x 3,3 nM, 1,1 nM, 0,4 nM, 0 nM. Los datos cinéticos correspondientes se proporcionan en la fig. 16.
- 20 Figura 18: sensograma de Biacore, que muestra la medición dependiente de la concentración de un agente ligante monovalente compuesto de una molécula de conector 8xC18 y Fab_{ss}' 1.4.168 frente al péptido IGF-1R fosforilado. La configuración del ensayo era la ilustrada en la fig. 15. Se inyectó una serie de concentración del péptido pIGF-1R a 30 nM, 10 nM, 2x 3,3 nM, 1,1 nM, 0,4 nM, 0 nM. Los datos cinéticos correspondientes se proporcionan en la fig. 16.
- 25 Figura 19: sensograma de Biacore, que muestra la medición dependiente de la concentración de un agente ligante bivalente compuesto de una molécula de conector 8xC18, Fab_{ss}' 30.433 y Fab_{ss}' 1.4.168 frente al péptido IGF-1R fosforilado. La configuración del ensayo era la ilustrada en la fig. 15. Se inyectó una serie de concentración del péptido pIGF-1R a 30 nM, 10 nM, 2x 3,3 nM, 1,1 nM, 0,4 nM, 0 nM. Los datos cinéticos correspondientes se proporcionan en la fig. 16.
- 30 Figura 20 (A): experimento de transferencia western con lisados de células Hek293 que se utilizaron para la generación de pellets de células 293 fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFIP). Se sometieron 5 µg de proteínas totales de cada lisado a SDS-PAGE y transferencia western. La detección ocurrió con un anticuerpo anti-fosfotirosina (Millipore, clon 4G10). (B) Resultados de los experimentos de IHQ con pellets de células Hek293. La molécula de detección compuesta de una molécula de conector 4xC18 (conector 12 del Ejemplo 2.4) y únicamente Fab_{ss} 4.1.15 o únicamente Fab_{ss} 7.2.32 no produjeron tinción en ninguno de los pellets de células Hek293 FFIP sometidos a ensayo (filas 1 y 2). En contraste, la detección con la molécula ligante dual completa (que consistía de ambos fragmentos Fab_{ss}' + conector 4xC18) condujo a tinción, pero sólo de las células sobreexpresantes HER3 de tipo salvaje que fueron estimuladas con NRG1-β1 (fila 3, columna 2). No se observó tinción sobre las células no estimuladas (fila 3, columna 1) y células estimuladas con NRG1-β1 que sobreexpresaban HER3(Y>F) mutado (sin sitio de fosforilación Tyr1289) en lugar de HER3 de tipo salvaje (fila 3, columna 3), respectivamente.

45 Ejemplo 1

45 Agente ligante bivalente a troponina-T

50 1.1 Anticuerpo monoclonales y fragmentos Fab'

50 Se utilizaron dos anticuerpos monoclonales ligantes de troponina T cardiaca humana a epítipos no solapantes diferentes, el epítipo A' y el epítipo B', respectivamente. Se utilizaron ambos anticuerpos en el ensayo de troponina T Elecsys™ de Roche actual, en el que se detecta la troponina T en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich.

55 La purificación de los anticuerpos monoclonales a partir del sobrenadante de cultivo se llevó a cabo utilizando métodos del estado de la técnica de química de las proteínas.

60 Los anticuerpos monoclonales purificados se digieren con proteasa, con papaína preactivada (mAb anti-epítipo A') o pepsina (mAb anti-epítipo B'), rindiendo fragmentos F(ab')₂ que posteriormente se redujeron a fragmentos Fab' con una baja concentración de cisteamina a 37°C, es decir A y B, respectivamente, en la fórmula I (A-a':a-S-b:b'-B). La reacción se detuvo separando la cisteamina en una columna Sephadex G-25 (GE Healthcare) de la parte de la muestra que contenía el polipéptido.

65 1.2 Conjugación de fragmentos Fab' con oligonucleótidos de ADNss

65 Los fragmentos Fab' se conjugaron con los oligonucleótidos ADNss_a y ADNss_b activados anteriormente indicados.

Preparación de los conjugados de Fab-fragmento-ADNss "A" y "B":

a) Conjugado Fab'-ADNss anti-troponina T<epítopo A'> (=A")

5 Para la preparación del conjugado Fab'-ADNss anti-troponina T<epítopo A'>, A", se utilizó un derivado de SEC ID nº 5, es decir, 5'-AGT CTA TTA ATG CTT CTG C (=SEC ID nº 5)-XXX-Y-Z-3', en el que X=propilén-fosfato introducido mediante la fosforamidita C3 (3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research), en la que Y=modificador 3'-amino C6 introducido mediante el modificador 3'-amino TFA amino C-6 Icaa CPG (ChemGenes) y en el que Z=4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxi introducido mediante 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (ThermoFischer).

b) Conjugado Fab'-ADNss anti-troponina T<epítopo B'> (=B")

15 Para la preparación del conjugado Fab'-ADNss_b anti-troponina T<epítopo B'> (B"), se utilizó un derivado de SEC ID nº 6, es decir, 5'-Y-Z-XXX-AGT TCT ATC GTC GTC CA-3', en el que X=propilén-fosfato introducido mediante la fosforamidita C3 (3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research), en la que Y=modificador 5'-amino C6 introducido mediante el modificador (6-(4-monometoxitritilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (Glen Research) y en el que Z=4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxi introducido mediante 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (ThermoFischer).

20 Los oligonucleótidos de SEC ID nº 5 o nº 6, respectivamente, se sintetizaron mediante métodos de síntesis de oligonucleótidos del estado de la técnica. La introducción del grupo maleimido se llevó a cabo mediante reacción del grupo amino de Y con el grupo succinimidilo de Z, que se incorporó durante el procedimiento de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.

25 Los constructos de ADN de cadena sencilla mostrados anteriormente portan un grupo maleimido reactivo con tiol que reacciona con una cisteína de la región bisagra de Fab' generada por el tratamiento de cisteamina. Con el fin de obtener un porcentaje elevado de fragmentos Fab' con marcaje único, se mantuvo baja la proporción molar relativa entre ADNss y fragmento Fab'. La purificación de los fragmentos Fab' con único marcaje (ADNss:Fab'=1:1) se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico (columna: MonoQ, GE Healthcare). La verificación del marcaje y purificación eficientes se llevó a cabo mediante cromatografía analítica de filtración en gel y SDS-PAGE.

1.3 Moléculas de conector biotiniladas

35 Los oligonucleótidos utilizados en los conectores de ADNss L1, L2 y L3, se sintetizaron mediante métodos de síntesis de oligonucleótidos del estado de la técnica y utilizando un reactivo fosforamidita biotinilado para la biotinilación.

40 Conector 1 (=L1), un conector 1 de ADNss biotinilado sin espaciado que presenta la composición siguiente:

5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T (Biotina-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'. Comprende oligonucleótidos de ADNss de SEC ID nº 7 y nº 8, respectivamente, y que se biotiniló mediante la utilización de biotina-dT (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-t-butilbenzoil)-biotinil)-aminohehexil]-3-acrilimido]-2'-desoxiuridín-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopopil)]-fosforamidita (Glen Research).

45 Conector 2 (=L2), un conector 2 de ADNss biotinilado con un espaciador 11-mero que presenta la composición siguiente:

50 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T5-(Biotina-dT)-T5 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'. Comprende oligonucleótidos de ADNss de SEC ID nº 7 y nº 8, respectivamente, dos tramos oligonucleótidos de cinco timidinas cada uno y se biotiniló mediante la utilización de biotina-dT (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-t-butilbenzoil)-biotinil)-aminohehexil]-3-acrilimido]-2'-desoxiuridín-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopopil)]-fosforamidita (Glen Research) en la parte media del espaciador.

55 Conector 3 (=L3), un conector 3 de ADNss biotinilado con un espaciador 31-mero que presenta la composición siguiente:

60 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T15-(Biotina-dT)-T15 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'. Comprende oligonucleótidos de ADNss de SEC ID nº 7 y nº 8, respectivamente, dos tramos oligonucleótidos de quince timidinas cada uno y se biotiniló mediante la utilización de biotina-dT (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-t-butilbenzoil)-biotinil)-aminohehexil]-3-acrilimido]-2'-desoxiuridín-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopopil)]-fosforamidita (Glen Research) en la parte media del espaciador.

1.4 Epítomos para los ligantes de troponina T monovalentes A y B, respectivamente

Se construyeron péptidos sintéticos que individualmente sólo presentaban una afinidad moderada para el fragmento Fab' correspondiente derivado de los anticuerpos anti-troponina T a y b, respectivamente.

a) el epítipo "A" para el anticuerpo a comprendido en:

SEC ID nº 9 = ERAEQQRIRAEREKEUUSLKDRIEKRRRAERAEmida, en la que U representa β -Alanina.

b) El epítipo "B" para el anticuerpo b comprendido en:

SEC ID nº 10 = SLKDRIERRRAERAEOERAQQRIRAEREKEEmida, en la que O representa ácido amino-trioxa-octanoico

Tal como apreciará el experto en la materia, resulta posible combinar dichos dos epítomos que contienen epítipo de dos maneras y ambas variantes han sido diseñadas y preparadas mediante la combinación lineal de los epítomos A' y B'. Las secuencias de ambas variantes, las secuencias lineales de los epítomos A'-B' (=TnT-1) y B'-A' (=TnT-2), respectivamente, se prepararon mediante métodos de síntesis peptídica del estado de la técnica.

Las secuencias de los epítomos A' y B' se modificaron en comparación con los epítomos originales en la secuencia de troponina T cardiaca humana (P45379/UniProtKB) con el fin de reducir la afinidad de unión para cada uno de los Fab. Bajo estas circunstancias, la dinámica del efecto de unión heterobivalente es más visible, por ejemplo mediante el análisis de la afinidad de unión con la tecnología Biacore™.

1.5 Análisis de interacciones biomoleculares

Para el presente experimento se utilizó un aparato Biacore™ 3000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ SA montado en el sistema a T=25°C. Se llevó a cabo el preacondicionamiento a 100 μ l/min. con 3x inyecciones de 1 min. de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y de 1 min. con HCl 10 mM.

Como tampón del sistema se utilizó HBS-ET (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,05). El tampón para muestras era idéntico al tampón del sistema.

Se reguló el sistema BIAcore 3000 utilizando el programa de control V1.1.1. Se saturó la celda de flujo 1 con 7 UR de D-biotina. En la celda de flujo 2, se inmovilizaron 1.063 UR de conector de ADNss biotinilado L1. En la celda de flujo 3, se inmovilizaron 879 UR de conector de ADNss biotinilado L2. En la celda de flujo 4, se capturaron 674 UR de conector de ADNss biotinilado L3.

A continuación, se inyectó el conjugado de ADN fragmento Fab' "A" a una concentración de 600 nM. El conjugado de ADN fragmento Fab' "B" se inyectó en el sistema a una concentración de 900 nM. Los conjugados se inyectaron durante 3 min. a un caudal de 2 μ l/min. Los conjugados se inyectaron consecutivamente para monitorizar la señal de saturación respectiva de cada conjugado de ADN fragmento Fab' en su conector respectivo. Las combinaciones de Fab' fueron con un único conjugado de ADN fragmento Fab' A", un único conjugado de ADN fragmento Fab' B" y ambos conjugados de ADN fragmento Fab' A" y B" presentes en el conector respectivo. Se generaron líneas base estables tras saturar los conectores con los conjugados de ADN fragmento Fab', que era un requisito previo para las mediciones cinéticas posteriores.

Los analitos peptídicos artificiales TnT-1 y TnT-2 se inyectaron como analitos en solución en el sistema con el fin de interactuar con los fragmentos Fab' presentados en la superficie.

Se inyectó TnT-1 a una concentración de 500 nM, se inyectó TnT-2 a una concentración de analito de 900 nM. Ambos péptidos se inyectaron a un caudal de 50 μ l/min durante un tiempo de asociación de 4 min. Se monitorizó la disociación durante 5 min. Se llevó a cabo la regeneración mediante una inyección de 1 min. a 50 μ l/min. de NaOH 50 mM sobre todas las celdas de flujo.

Se determinaron los datos cinéticos utilizando el software Biaevaluation (v. 4.1). Se determinó la tasa de disociación k_d (1/s) de los péptidos TnT-1 y TnT-2 a partir de las combinaciones de fragmento Fab' presentadas en superficie respectivas siguiendo un modelo de ajuste lineal 1:1 de Langmuir. La semivida del complejo en min. se calculó según la solución de la ecuación cinética de primer orden siguiente: $\ln(2)/(60 \cdot k_d)$.

Resultados:

Los datos experimentales proporcionados en las Tablas 1 y 2 demuestran un incremento de la estabilidad del complejo entre analito (TnT-1 o TnT-2), respectivamente, y los diversos dímeros Fab'-Fab' heterobivalentes A"-B" en comparación con el conjugado monovalente de ADNds Fab' A" o B". Se observó dicho efecto en cada Tabla en la línea 1 en comparación con las líneas 2 y 3.

Tabla 1: datos del análisis utilizando TnT-1 con conectores de diversa longitud

a) Conector L1			
Conjugado de ADN fragmento Fab' A''	Conjugado de ADN fragmento Fab' B''	k_d (1/s)	$T_{1/2}$ dis. (min.)
X	X	6,6E-03	1,7
X	-	3,2E-02	0,4
-	X	1,2E-01	0,1
b) Conector L2			
Conjugado de ADN fragmento Fab' A''	Conjugado de ADN fragmento Fab' B''	k_d (1/s)	$T_{1/2}$ dis. (min.)
X	X	4,85E-03	2,4
X	-	2,8E-02	0,4
-	X	1,3E-01	0,1
c) Conector L3			
Conjugado de ADN fragmento ab' A''	Conjugado de ADN fragmento Fab' B''	k_d (1/s)	$T_{1/2}$ dis. (min.)
X	X	2,0E-03	5,7
X	-	1,57E-02	0,7
-	X	1,56E-02	0,7

Tabla 2: datos del análisis utilizando TnT-2 con conectores de diversa longitud

a) Conector L1			
Conjugado de ADN fragmento Fab' A''	Conjugado de ADN fragmento Fab' B''	k_d (1/s)	$T_{1/2}$ dis. (min.)
X	X	1,4E-02	0,8
X	-	4,3E-02	0,3
-	X	1,4E-01	0,81
b) Conector L2			
Conjugado de ADN fragmento Fab' A''	Conjugado de ADN fragmento Fab' B''	k_d (1/s)	$T_{1/2}$ dis. (min.)
X	X	4,9E-03	2,3
X	-	3,5E-02	0,3
-	X	1,3E-01	0,1
c) Conector L3			
Conjugado de ADN fragmento Fab' A''	Conjugado de ADN fragmento Fab' B''	k_d (1/s)	$T_{1/2}$ dis. (min.)
X	X	8,0E-03	1,5
X	-	4,9E-02	0,2
-	X	3,2E-01	0,04

5 El efecto de avidéz es dependiente además de la longitud del conector. En las sub-tablas mostradas en la Tabla 1, es decir, para el analito artificial TnT-1, el conector L3 que comprende un espaciador 31-mero basado en timidina mostraba la tasa de disociación más baja o la estabilidad del complejo más alta.

10 En las sub-tablas mostradas en la Tabla 2, el conector L2 que comprende un espaciador 11-mero basado en timidina mostraba la tasa de disociación más baja o la estabilidad del complejo más alta para el analito artificial TnT-2.

15 Estos datos conjuntamente demuestran que la flexibilidad de la longitud de conector como inherente al enfoque proporcionado en la presente invención resulta de gran utilidad y muy ventajoso.

Ejemplo 2

Agente ligante bivalente a IGF-1R fosforilado

20 2.1 Desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAb 8.1.2, mAb 1.4.168 y mAb 30.4.33)

a) Inmunización de los ratones:

25 Se inmunizaron ratones BALB/C en las semanas 0, 3, 6 y 9. En cada inmunización se utilizaron 100 µg del conjugado que comprendía el péptido pIGF-1R fosforilado (1340-1366) (SEC ID nº 11). Dicho péptido había sido fosforilado en la tirosina 1346 (=1346-ptyr) y acoplado con KLH mediante la cisteína C-terminal (=Aoc-Cys-MP-KLH-1340), rindiendo el conjugado utilizado para la inmunización. En las semanas 0 y 6 se llevó a cabo la inmunización por vía intraperitoneal y en las semanas 3 y 9, por vía subcutánea, en diversas partes del cuerpo de los ratones.

b) Fusión y clonación:

Se fusionaron células de bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma según Galfre G. y Milstein C., Methods in Enzymology 73:3-46, 1981. En este procedimiento, se mezclaron aproximadamente 1×10^8 células de bazo de un ratón inmunizado con 2×10^7 células de mieloma a(P3X63-Ag8653, ATCC nº CRL 1580) y se centrifugaron (10 min. a 250 g y a 37°C). A continuación, las células se lavaron una vez con medio RPMI1640 sin suero de feto bovino (SFB) y se centrifugaron nuevamente a 250 g en un tubo cónico de 50 ml. Se descartó el sobrenadante, el sedimento celular se desenganchó cuidadosamente con golpe suaves, se añadió 1 ml de PEG (peso molecular: 4.000, Merck, Darmstadt) y se mezcló mediante pipeteado. Tras 1 min. de incubación en un baño de agua a 37°C, se añadieron gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin SFB a temperatura ambiente en un periodo de 4 a 5 min. Se repitió esta etapa con 10 ml adicionales de RPMI 1640 sin SFB. A continuación, se añadieron 25 ml de RPMI 1640 que contenía SFB al 10% mediante una etapa de incubación a 37°C, con 5% de CO₂ durante 30 minutos. Tras centrifugar durante 10 min. a 250 g y a 4°C, se introdujeron las células sedimentadas en medio RPMI 1640 que contenía SFB al 10% y se sembraron en medio de selección de hipoxantina-azaserina (100 mmoles/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina en RPMI 1640 + SFB al 10%). Se añadió interleuquina-6 (100 U/ml) al medio a modo de factor de crecimiento. Tras 7 días, se intercambió el medio por medio fresco. El día 10, se sometieron a ensayo los cultivos primarios para anticuerpos específicos. Se clonaron los cultivos primarios positivos en placas de cultivo celular de 96 pocillos mediante un separador celular activado por fluorescencia.

c) Aislamiento de inmunoglobulinas a partir de los sobrenadantes de cultivo celular

Las células de hibridoma obtenidas se sembraron a una densidad de 1×10^7 células en matraces CELLline 1000 CL (Integra). Se recolectaron dos veces a la semana sobrenadantes celulares de hibridoma que contenían IgG. Los rendimientos típicamente estaban comprendidos entre 400 µg y 2.000 µg de anticuerpo monoclonal por cada 1 ml de sobrenadante. La purificación del anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo se llevó a cabo utilizando métodos convencionales de la química de las proteínas (por ejemplo según Bruck C., Methods in Enzymology 121:587-596, 1986).

2.2 Síntesis de oligonucleótidos hibridables

Se sintetizaron los precursores modificados en amino siguientes, que comprendían las secuencias proporcionadas en SEC ID nº 5 y nº 6, respectivamente, siguiendo métodos estándares. Los oligonucleótidos proporcionados posteriormente no sólo comprenden el amino-conector denominado, sino también un pigmento fluorescente. Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, dicho pigmento fluorescente resulta muy conveniente para facilitar la purificación del oligonucleótido solo, así como de componentes que lo comprenden.

a) 5'-Fluoresceína-AGT CTA TTA ATG CTT CTG C-(espaciador C3)3-C7Aminoconector-,

b) 5'-Cy5 AGT CTA TTA ATG CTT CTG C-(espaciador C3)3-C7Aminoconector,

c) 5'-Aminoconector-(espaciador C3)3-AGT TCT ATC GTC GTC CA-Fluoresceína-3',

d) 5'-Fluoresceína-(beta L AGT CTA TTA ATG CTT CTG C)-(espaciador C3)3-C7Aminoconector (beta L indica que éste es un oligonucleótido de L-ADN) y

e) 5'-Aminoconector-(espaciador C3)3-(beta L-AGT TCT ATC GTC GTC CA)-Fluoresceína-3' (beta L indica que éste es un oligonucleótido de L-ADN).

Se llevó a cabo la síntesis en un sintetizador ABI 394 a una escala de 10 µmoles en el modo de activación de tritilos ('on') (para la modificación 5'-amino) o el modo de reposo de tritilos ('off') (para la modificación 3'-amino) utilizando CPG disponible comercialmente como soportes sólidos y fosforamiditas estándares dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) (Sigma Aldrich).

Las amiditas, modificadores amino y soportes CPG siguientes se utilizaron para introducir el espaciador C3, un pigmento y fracciones amino, respectivamente, durante la síntesis de oligonucleótidos:

Espaciador fosforamidita C3 (3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research);

Se introdujo modificador 5'-amino mediante la utilización del modificador de 5'-amino C6 (6-(4-monometoxitritilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (Glen Research),

5-Fluoresceína fosforamidita 6-(3',6'-dipivaloilfluoresceinil-6-carboxamido)-hexil-1-O-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (Glen Research),

Fosforamidita Cy5TM cloruro de 1-[3-(4-monometoxitritiloxi)propil]-1'-[3-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropilfosforamiditil)propil]-3,3',3'-tetrametil-indo-dicarbocianina (Glen Research),

Fluoresceína LightCycler CPG 500 A (Roche Applied Science), y

Modificador 3'-amino TFA amino C-6 Icaa CPG 500 A (Chemgenes).

Para los oligonucleótidos marcados con Cy5, se utilizaron fosforamiditas dA(tac), dT, dG(tac), dC(tac) (Sigma Aldrich) y se llevó a cabo la desprotección con amonio al 33% durante 2 h a temperatura ambiente.

Se sintetizaron oligonucleótidos de L-ADN mediante la utilización de las fosforamiditas beta-L-dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) (Chemgenes).

La purificación de los oligonucleótidos hibridables modificados con fluoresceína se llevó a cabo mediante un procedimiento en dos etapas: en primer lugar, se purificaron los oligonucleótidos en HPLC de fase inversa (Merck-Hitach-HPLC, columna RP-18, sistema de gradiente [A: (Et₃NH)OAc 0,1 M (pH 7,0)/MeCN 95:5; B: MeCN]: 3 min., 20% de B en A, 12 min., 20%-50% de B en A y 25 min., 20% de B en A, caudal: 1,0 ml/min., detección a 260 nm. Las fracciones (monitorizadas mediante RP-HPLC analítica) que contenían el producto deseado se agruparon y se evaporaron a sequedad. (los oligonucleótidos modificados en el extremo 5' con grupo alquilamino protegido con monometoxitritilo se destritaron mediante incubación con ácido acético al 20% durante 20 min.). Los oligómeros que contenían fluoresceína como marcaje se purificaron nuevamente mediante cromatografía IEX en una HPLC [columna Mono Q: tampón A: hidróxido sódico (10 mM/l; pH~12). Tampón B: cloruro sódico 1 M disuelto en hidróxido sódico (10 mM/l, pH~12), gradiente: en 30 minutos de 100% de tampón A a 100% de tampón B, caudal: 1 ml/min., detección a 260 nm]. El producto se desaló mediante diálisis.

Se utilizaron oligómeros marcados con Cy5 tras la primera purificación en HPLC de fase inversa (Merck-Hitach-HPLC, columna RP-18, sistema de gradiente [A: (Et₃NH)OAc 0,1 M (pH 7,0)/MeCN 95:5; B: MeCN]: 3 min., 20% de B en A, 12 min., 20%-50% de B en A y 25 min., 20% de B en A, caudal: 1,0 ml/min., detección a 260 nm. Los oligómeros se desalaron mediante diálisis y se liofilizaron en un evaporador Speed-Vac, rindiendo sólidos que se congelaron a -24°C.

2.3 Activación de oligonucleótidos hibridables

Los oligonucleótidos de amino modificado del Ejemplo 2 se disolvieron en tampón de borato sódico 0,1 M, pH 8,5 (c=600 µmoles) y se hicieron reaccionar con un exceso molar de 18 veces de sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato disuelto en DMF (c=3 mg/100 µl) de Thermo Scientific. El producto de reacción se dializó por completo frente a agua con el fin de eliminar el producto de hidrólisis de 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfoSMCC.

Se concentró el dializado mediante evaporación y se utilizó directamente para la conjugación con un ligante monovalente que comprendía un grupo tiol.

2.4 Síntesis de oligonucleótidos conectores que comprenden oligonucleótidos hibridables en ambos extremos

Se sintetizaron oligonucleótidos mediante métodos estándares en un sintetizador ABI 394 a una escala de 10 µmoles en el modo de activación de tritilos ('on') utilizando dT-CPG disponible comercialmente como soporte sólido y utilizando fosforamiditas estándares dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) (Sigma Aldrich).

Se sintetizaron oligonucleótidos de L-ADN mediante la utilización de beta-L-dT-CPG como soporte sólidoA(bz) y las fosforamiditas beta-L-dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) disponibles comercialmente (Chemgenes).

La purificación de los oligonucleótidos se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 2.3, en un HPLC de fase inversa. Las fracciones (analizadas/monitorizadas mediante RP-HPLC analítica) que contenían el producto deseado se agruparon y se evaporaron a sequedad. Se llevó a cabo la destritaración mediante incubación con ácido acético al 80% durante 15 min. Se eliminó el ácido acético mediante evaporación. Se disolvió el remanente en agua y se liofilizó.

Las amiditas y soportes CPG siguientes se utilizaron para introducir el espaciador C18, digoxigenina y el grupo biotina durante la síntesis de los oligonucleótidos:

Espaciador fosforamidita 18 (18-O-dimetoxitritilhexaetilenglicol, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research),

Biotina-dT (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-t-butilbenzoil)-biotinil)-aminohexil]-3-acrilimido]-2'-desoxiuridín-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research),

Biotina-fosforamidita 1-dimetoxitritiloxi-2-(N-biotinil-4-aminobutil)-propil-3-O-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita y

5 5'-Dimetoxitritil-5-[N-(trifluoroacetilamino)hexil]-3-acrilimido]-2'-desoxiuridina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita para la modificación con amino y el post-marcaje con éster de digoxigenina-N-hidroxisuccinimidilo.

Se sintetizaron los constructos de puente o conectores siguientes:

- 10 Conector 1: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 2: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(T40)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- 15 Conector 3: 5'-[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Biotina-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 4: 5'-[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T5-(Biotina-dT)-T5-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 5: 5'-[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T20-(Biotina-dT)-T20-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- 20 Conector 6: 5'-[B-L] G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T30-(Biotina-dT)-T30-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 7: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T5-(Biotina-dT)-T5 TG GAC GAC GAT AGA ACT-3'
- Conector 8: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T10-(Biotina-dT)-T10 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- 25 Conector 9: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T15-(Biotina-dT)-T15 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 10: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T20-(Biotina-dT)-T20 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- 30 Conector 11: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-Espaciador C18- (Biotina-dT)-Espaciador C18-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 12: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Espaciador C18)²-(Biotina-dT)-(Espaciador C18)²-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- 35 Conector 13: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Espaciador C18)³-(Biotina-dT)-(Espaciador C18)³-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 14: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Espaciador C18)⁴-(Biotina-dT)-(Espaciador C18)⁴-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- 40 Conector 15: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T20-(Dig-dT)-T20-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- Conector 16: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Dig-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'
- 45 Conector 17: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Biotina-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

50 Los ejemplos de constructo de puente anteriormente indicados comprenden por lo menos un primer oligonucleótido hibridable y un segundo oligonucleótido hibridable. Los conectores 3 a 17 además de los segmentos de ácidos nucleicos hibridables comprenden una timidina central biotinilada o digoxigenilada o un espaciador que consiste de unidades de timidina de la longitud proporcionada anteriormente.

55 El oligonucleótido hibridable en 5' corresponde a SEC ID nº 7 y el oligonucleótido hibridable en 3' corresponde a SEC ID nº 8, respectivamente. El oligonucleótido de SEC ID nº 7 se hibrida con facilidad con el oligonucleótido de SEC ID nº 5. El oligonucleótido de SEC ID nº 8 se hibrida con facilidad con el oligonucleótido de SEC ID nº 6.

60 En los ejemplos de constructo de puente anteriormente indicados, [B-L] indica que se proporciona la secuencia oligonucleotídica de L-ADN; espaciador C 18, biotina y biotina-dT, se refieren, respectivamente, a espaciador C18, biotina y biotina-dT derivados de los bloques constructivos proporcionados anteriormente, y T con un número indica el número de residuos de timidina incorporados en el conector en la posición proporcionada.

2.5 Ensamblaje de constructo ligante dual

65 A) Corte de IgG y marcaje de fragmentos Fab' con ADNss

Se cortaron los anticuerpos monoclonales purificados con ayuda de la proteasa pepsina, rindiendo fragmentos F(ab')₂ que posteriormente se redujeron a fragmentos Fab' mediante el tratamiento con concentraciones bajas de cisteamina a 37°C. La reacción se detuvo mediante separación de la cisteamina en una columna PD 10. Los fragmentos Fab' se marcaron con un oligonucleótido activado tal como se produce según el Ejemplo 3. Este ADN de cadena sencilla (=ADNss) porta un grupo maleimido reactivo con tiol que reacciona con las cisteínas de la región bisagra de Fab'. Con el fin de obtener un porcentaje elevado de fragmentos Fab' con marcaje único, se mantuvo baja la proporción molar relativa entre ADNss y fragmento Fab'. La purificación de los fragmentos Fab' de marcaje único (ADNss: Fab'=1:1) se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico (columna: fuente 15 Q PE 4.6/100, Pharmacia/GE). La verificación de la purificación eficiente se llevó a cabo mediante filtración en gel analítica y SDS-PAGE.

B) Ensamblaje de un ligante dual anti-pIGF-1R

El ligante dual anti-pIGF-1R se basa en dos fragmentos Fab' con diana en epítomos diferentes del dominio intracelular de IGF-1R: Fab' 8.1.2 detecta un sitio de fosforilación (pTyr 1346) y Fab' 1.4.168, un sitio no fosforilado de dicha proteína diana. Los fragmentos Fab' se unieron covalentemente a ADN de cadena sencilla (ADNss): Fab' 1.4.168 a un ADNss 17-mero que comprendía la SEC ID nº 6 y que contenía fluoresceína como marcador fluorescente y Fab' 8.1.2 a un ADNss 19-mero que comprendía SEC ID nº 5 y que contenía Cy5 como marcador fluorescente. A continuación, dichos Fab con ADNss 17-mero o 19-mero unido covalentemente se denominaron Fab'_ss 1.4.168 y Fab'_ss 8.1.2, respectivamente. El ensamblaje de ligante dual está mediado por un conector (es decir, un constructo de puente que comprende dos oligonucleótidos de ADNss complementarios (SEC ID nº 7 y nº 8, respectivamente) que se hibridan con los ADNss correspondientes de los fragmentos Fab'_ss. La distancia entre los dos fragmentos Fab'_ss del ligante dual pueden modificarse mediante la utilización de espaciadores, por ejemplo espaciador C18 o ADN de longitud diferente, respectivamente.

Para la evaluación del ensamblaje, los componentes de ligante dual Fab'_ss 8.1.2, Fab'_ss 1.4.168 y los constructos de conector (I) (=conector 17 del Ejemplo 2.4) 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT T(-Bi)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' y (II) (=conector 10 del Ejemplo 2.4) 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT- (T 20)-T(-Bi)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' se mezclaron en cantidades equimolares a temperatura ambiente. Tras una etapa de incubación de 1 minuto, se analizó la mezcla de reacción en una columna de filtración en gel analítica (Superdex™ 200, 10/300 GL, GE Healthcare). La comparación de los volúmenes de elución (V_E) de los componentes del ligante dual individual con el V_E de la mezcla de reacción demuestra que se ha formado con éxito el ligante dual (fig. 1). (La timidina biotinilada (T(-Bi)) en la parte intermedia de ambos conectores no presenta una función en estos experimentos).

2.6 Experimento Biacore™ de evaluación de la unión del ligante dual anti-pIGF-1R a los péptidos inmovilizados IGF-1R y RI

Para el presente experimento se utilizó un aparato Biacore™ 2000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ SA montado en el sistema a T=25°C. Se llevó a cabo el preacondicionamiento a 100 µl/min. con 3x inyecciones de 1 min. de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y de 1 min. con HCl 10 mM.

Como tampón del sistema se utilizó HBS-ET (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,05%). El tampón para muestras era idéntico al tampón del sistema. Se reguló el sistema BIACore 2000 utilizando el programa de control V1.1.1.

A continuación, se capturaron los péptidos biotinilados sobre la superficie de SA en las celdas de flujo respectivas. Se capturaron 16 UR de IGF-1R(1340-1366) [1346-pTyr; Glu(Bi-PEG-140)]amida (es decir, el péptido fosforilado en la tirosina 1346 de SEC ID nº 11 que comprendía un conector PEG unido mediante el ácido glutámico correspondiente a la posición 1340 y biotinilado en el otro extremo del conector) en la celda de flujo 2. Se capturaron 18 UR de IGF-1R(1340-1366); Glu(Bi-PEG-1340)]amida (es decir, el péptido no fosforilado en la tirosina 1346 de SEC ID nº 11 que comprendía un conector PEG unido mediante el ácido glutámico correspondiente a la posición 1340 y biotinilado en el otro extremo del conector) en la celda de flujo 3. Se capturaron 20 UR de hIR(1355-1382)[1361-pTyr; Glu(Bi-PEG-1355)]amida (es decir, el péptido fosforilado en la tirosina 1361 de SEC ID nº 12 que comprendía un conector PEG unido mediante el ácido glutámico correspondiente a la posición 1355 del receptor de insulina humano y biotinilado en el otro extremo del conector) en la celda de flujo 4. Finalmente todas las celdas de flujo se saturaron con d-biotina.

Para la formación del ligante dual, se utilizó el protocolo de ensamblaje indicado en el Ejemplo 2.5. Al realizar operaciones individuales con sólo uno de los dos Fab'_ss, la ausencia o presencia del ADN conector no afectó a las curvas de asociación o disociación (datos no mostrados).

Se inyectaron 100 nM de analito (es decir, en estos experimentos, un agente ligante dual bivalente) en solución a un caudal de 50 µl/min. durante un tiempo de asociación de 240 s y se monitorizó la disociación durante 500 s. Se consiguió una regeneración eficiente mediante la utilización de una etapa de inyección de 1 min. a un caudal de 50 µl/min. con NaOH 80 mM. La celda de flujo 1 sirvió de referencia. Se utilizó una inyección de tampón de blanco en lugar de una inyección de antígeno para el doble referenciado de los datos mediante resta de la señal del tampón.

En cada ciclo de mediciones, se inyectó uno de los analitos en solución siguientes sobre la totalidad de las 4 celdas de flujo: Fab'_ss 8.1.2 100 nM, Fab'_ss 1.4.168 100 nM, una mezcla de Fab'_ss 8.1.2 100 nM y Fab'_ss 100 nM, agente ligante bivalente 100 nM que consistía de Fab'_ss 8.1.2 y Fab'_ss 1.4.168 hibridados con el conector III) (5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(20)-T(-Dig)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'(=conector 15 del Ejemplo 2.4)) y agente ligante bivalente 100 nM que consistía de Fab'_ss 8.1.2 y Fab'_ss 1.4.168 hibridados con el conector (IV) (5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(-Dig) -TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'(=conector 16 del Ejemplo 2.4)), respectivamente. (La digoxigenilación de la timidina intermedia (T(-Dig)) en los conectores anteriormente indicados no es relevante a estos experimentos).

10 Se monitorizaron las señales como sensogramas de Biacore™ dependientes del tiempo.

Se establecieron puntos de obtención de datos al final de la etapa de asociación de analito ("Binding Late", BL) y al final de la etapa de disociación de analito ("Stability Late", SL) para monitorizar las alturas de la señal de la unidad de respuesta de cada interacción. Se calcularon las tasas de disociación kd (1/s) según el ajuste lineal 1:1 de Langmuir utilizando el software de evaluación Biacore™ 4.1. Se calcularon las semividas de los complejos, en minutos, según la fórmula $\ln(2)/(60 \cdot kd)$.

Los sensogramas (fig. 2-5) muestran una ganancia tanto de especificidad como de estabilidad de los complejos en la unión de pIGF-1R al utilizar Fab'_ss 1.4.168 y Fab'_ss 1.4.168 en forma de un ligante dual (=agente ligante bivalente), probablemente debido al efecto de unión cooperativa subyacente. Fab' 1.4.168 por sí solo no muestra reactividad cruzada con el péptido pRI pero no discrimina entre la forma fosforilada y no fosforilada de IGF-1R (T1/2dis=3 min. en ambos casos). Sin embargo, Fab' 8.1.2 se une únicamente a la versión fosforilada del péptido IGF-1R, aunque muestra cierta reactividad cruzada no deseada con el receptor de insulina fosforilado. El ligante dual discrimina bien entre el péptido pIGF-1R y los dos otros péptidos (ver la fig. 4) y, de esta manera, ayuda a superar problemas de unión no específica. Observar que la ganancia de especificidad se pierde al aplicar ambos Fab sin ADN conector (fig. 5). La ganancia de afinidad del ligante dual para el péptido pIGF-1R se mantiene en semividas de disociación incrementadas en comparación con los Fab individuales y la mezcla de Fab' que omiten el ADN conector (figs. 3 y 5). Aunque los ligantes duales sometidos a ensayo con dos longitudes de ADN conector diferentes comparten un efecto global positivo sobre la especificidad y afinidad de unión a la diana, el conector más largo ((III) con T40-T-Dig como espaciador) (es decir, el conector 15 del Ejemplo 2.4) aparentemente resulta ventajoso con respecto a ambos criterios.

2.7 Ensayo Biacore™ de tipo sándwich de M-1.4.168-IgG y M-8.1.2-IgG

35 Se utilizó un instrumento Biacore™ T100 (GE Healthcare) con un sensor Biacore CM5 incorporado en el sistema. El sensor se preacondicionó mediante una inyección de 1 minuto a un caudal de 100 µl/minuto de SDS al 0,1%, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H₃PO₄ 100 mM.

40 Como tampón del sistema se utilizó HBS-ET (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,05%). El tampón para muestras era el tampón del sistema.

Se reguló el sistema Biacore T100 utilizando el programa de control V1.1.1. Se inmovilizó anticuerpo IgG policlonal de conejo <lgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) a un caudal de 30 µg/ml en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) a 10.000 UR en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4, respectivamente, mediante una reacción de EDC/NHS siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se bloqueó la superficie del sensor con una solución de etanolamina 1 M. El experimento completo se llevó a cabo a 13°C.

50 Se capturó mAb primario 500 nM M-1.004.168-IgG durante 1 min. a un caudal de 10 µl/min sobre la superficie <lgGFCyM>R. Se inyectaron 3 µM de una mezcla de fragmentos de IgG (de las clases de IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) que contenía solución de bloqueo a un caudal de 30 µl/min durante 5 min. Se inyectó el péptido IGF-1R(1340-1366)[1356-pTyr; Glu(Bi-PEG-1340)amida a 300 nM durante 3 min. a un caudal de 30 µl/min. Se inyectaron 300 nM de anticuerpo secundario M-8.1.2-IgG a un caudal de 30 µl/min. El sensor se regeneró utilizando glicina 10 mM-HCl, pH 1,7, a 50 µl/min. durante 3 min.

55 La fig. 6 describe la configuración del ensayo. En la fig. 7 se proporcionan los resultados de las mediciones. Las mediciones indican claramente que ambos anticuerpos monoclonales fueron capaces de unirse simultáneamente a dos epítopos diferentes no relacionados en su péptido diana respectivo. Lo anterior es un requisito previo para cualesquier experimentos posteriores con el objetivo de generar sucesos de unión cooperativa.

60 2.8 Ligante dual de ensayo Biacore™ sobre la superficie del sensor

Se utilizó un aparato Biacore™ 3000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ SA montado en el sistema a T=25°C. Se llevó a cabo el preacondicionamiento a 100 µl/min. con 3x inyecciones de 1 min. de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y de 1 min. con HCl 10 mM.

65

Como tampón del sistema se utilizó HBS-ET (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,05%). El tampón para muestras era el tampón del sistema.

Se reguló el sistema BIAcore™ 3000 utilizando el programa de control V1.1.1.

Se capturaron 124 UR de amino-PEO-biotina en la celda de flujo de referencia 1. Se capturaron 1595 UR de T0-Bi ADNss 37-mero-conector de 14,6 kDa biotinilado (I) (5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(-Bi)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3') (=conector 17 del Ejemplo 2.4) y 1042 UR de T40-Bi ADNss 77-mero-conector (II) de 23,7 kDa biotinilado (5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(20)-(Biotina-dT)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'=conector 10 del Ejemplo 2.4) sobre celdas de flujo diferentes.

Se inyectaron 300 nM de Fab'_ss 8.1.2 y 300 nM de Fab'_ss 1.004.168 en el sistema a un caudal de 50 µl/min. durante 3 min. Como control únicamente se inyectaron 300 nM de Fab'_ss 8.1.2 o 300 nM de Fab'_ss 1.004.168 para someter a ensayo la contribución cinética de cada Fab'_ss. Como control se inyectó tampón en lugar de los Fab'_ss. Se inyectaron los péptidos pIR(1355-1382)[1361-pTyr]amida e IGF-1R(1340-1366)amida, respectivamente, en el sistema a un caudal de 50 µl/min. durante 4 min., libres en solución, en etapas de concentración de 0 nM, 4 nM, 11 nM, 33 nM (dos veces), 100 nM y 300 nM. En otro conjunto de experimentos para medir las afinidades para el péptido pIGF-1R(1340-1366)[1346-pTyr]amida, se utilizaron las etapas de concentración de 0 nM, 0,4 nM, 1,1 nM, 3,3 nM (dos veces), 10 nM y 30 nM.

Se monitorizó la disociación a un caudal de 50 µl/min. durante 5,3 min. Se regeneró el sistema tras cada etapa de concentración con un pulso de 12 s de NaOH 250 mM y se recargó con ligando de Fab'_ss.

La figura 8 indica esquemáticamente la configuración del ensayo en el aparato Biacore™. La tabla proporcionada en la figura 9 muestra los resultados de la cuantificación obtenidos con este enfoque. Las figuras 10, 11 y 12 ilustran resultados de Biacore™ ejemplares de dicha configuración de ensayo utilizando el agente ligante dual T40.

La tabla en la figura 9 demuestra los beneficios del concepto de ligante dual. El agente ligante dual T40 (un agente ligante dual con el conector 10 del Ejemplo 2.4, es decir, un conector con un espaciador de T20-biotina-dT-T20) resulta en una semivida del complejo de antígeno mejorada en 2 veces (414 min.) y una afinidad mejorada en 3 veces (10 pM) en comparación con el agente ligante dual T0 (es decir, un agente ligante dual con el conector 16 del Ejemplo 2.4), con 192 min. y 30 pM, respectivamente. Lo anterior subraya la necesidad de optimizar la longitud del conector para generar el efecto de unión cooperativa óptimo.

El agente ligante dual T40 (es decir, el agente ligante dual que comprende el conector T40-Bi (el conector 10 del Ejemplo 2.4)) muestra una afinidad de 10 pM para el péptido IGF-1R fosforilado (tabla en las figs. 9 y 10). Lo anterior es una mejora de la afinidad de 2.400 veces respecto al péptido receptor de insulina fosforilado (24 nM) y una mejora de 100 veces respecto al péptido IGF-1R no fosforilado.

Por lo tanto, se alcanza el objetivo de incrementar la especificidad y la afinidad mediante la combinación de dos sucesos de unión diferentes y separados.

El efecto de unión cooperativa se pone especialmente de manifiesto a partir de las tasas de disociación frente al péptido IGF-1R fosforilado, en donde el ligante dual muestra una semivida del complejo de antígeno de 414 min., frente a 0,5 min. con el ligante monovalente 8.1.2 por sí solo y frente a 3min. con el ligante monovalente 1.4.168 por sí solo, respectivamente.

Además, el constructo totalmente ensamblado multiplica aproximadamente sus tasas de disociación kd (1/s) en comparación con los constructos hibridados con Fab' individualmente (figs. 10, 11, 12 y tabla en la fig. 9). Resulta interesante que también la tasa de asociación ka (1/Ms) se incrementa ligeramente en comparación con los sucesos de interacción de Fab' únicamente; lo anterior podría deberse a un incremento de la flexibilidad molecular del constructo.

Un sistema diagnóstico que utilice un procedimiento de lavado intenso debería definitivamente fomentar un rendimiento elevado del agente ligante dual T40, en contraste con las moléculas Fab' individuales (monovalentes). El constructo hibridado, es decir, un agente ligante bivalente según la presente invención, genera un suceso de unión específico y bastante estable, mientras que los ligantes monovalentes se disocian más rápidamente, por ejemplo resultan eliminados por lavado más rápidamente.

2.9 Evaluación de una molécula ligante dual anti-pIGF-1R en experimentos inmunohistoquímicos (IHQ):

Los experimentos IHQ descritos en la presente memoria se llevaron a cabo en la plataforma BenchMark XT de Ventana. para el ensayo, se utilizó un ligante dual anti-pIGF-1R que consistía de Fab'_ss 1.4.168 (ligante de n epitopo no fosforilado del dominio intracelular de IG-F1R), Fab'_ss 30.4.33 (ligante del fosfoepitopo pTyr1346 del dominio intracelular de IGF-1R) y un conector flexible. La generación del anticuerpo 1.4.168 ha sido descrita en el Ejemplo 2.1 y el anticuerpo 30.4.33 (cadena pesada de región variable mostrada en SEC ID nº 19 y cadena ligera de

región variable mostrada en SEC ID nº 20, respectivamente) ha sido producido utilizando los mismos procedimientos que los indicados en dicho ejemplo. El fragmento Fab' de 30.4.33 presenta una afinidad mayor para el sitio de fosforilación pTy4 1346 de IGF-1R que el fragmento Fab' anteriormente utilizado del anticuerpo 8.1.2 (T1/2 dis. de Fab'_ss 8.1.2 ~0,5 MIN., T1/2 dis. de Fab'_ss 30.4.33 ~7 min.).

Se utilizaron conectores flexibles con espaciadores de diferente longitud (=conector 11, 12, 13 y 14 del Ejemplo 2.4) en el presente ensayo. Un marcaje de biotina dentro de la molécula de detector sirvió como etiqueta de detección para el kit de detección iVIEW DAB de Ventana basado en estreptavidina.

Con el fin de someter a ensayo la especificidad de la molécula de ligante dual anti-pIGF-1R, se utilizó un sofisticado sistema de ensayo basado en células 3T3 fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFIP). Las células 3T3 habían sido transfectadas establemente con vectores de expresión de IGF-1R o RI. Las células se fijaron con formalina y se incluyeron en parafina siguiendo protocolos estándares. Antes de la fijación, las células se estimularon con 100 ng/ml de IGF-1 o insulina para inducir la fosforilación de IGF-1R o RI o se dejaron sin tratar. Los experimentos de transferencia western (fig. 13A) demostraron la estimulación con éxito de la fosforilación del receptor.

Para la detección se utilizaron 0,5 µg/ml por fragmento Fab'_ss de sólo Fab'_ss 1.4.168 o sólo Fab'_ss 30.4.33, respectivamente, y una cantidad equimolar de conector 8xC18, así como una mezcla de ambos fragmentos Fab'_ss, Fab'_ss 1.4.168 y Fab'_ss 30.4.33 (ambos a una concentración de 0,5 µg/ml) y una cantidad equimolar de conector 8xC18, respectivamente. Un marcaje de biotina dentro de la molécula de detector sirvió como etiqueta de detección para el kit de detección iVIEW DAB de Ventana basado en estreptavidina. Datos del protocolo Benchmark: el pretratamiento se realizó con tampón de acondicionamiento celular 1 (AC1), el tiempo de incubación de la molécula de unión fue de 32 min. y la temperatura de incubación, de 37°C.

Una molécula de detección compuesta de una molécula de conector 8xC18 (el conector 14 del Ejemplo 2.4) y únicamente Fab'_ss 1.4.168 o únicamente Fab'_ss 30.4.33 no generó tinción en ninguno de los pellets de células 3T3 FFIP sometidos a ensayo (fig. 13B, filas 1 y 2). En contraste, la detección con la molécula ligante dual completa (que consistía de ambos fragmentos Fab'_ss + conector 8xC18) condujo a tinción, pero sólo de las células sobreexpresantes de IGF-1R que habían sido estimuladas con IGF-1 (fig. 13B, fila 3). No se observó reactividad cruzada sobre células que sobreexpresaban RI ni siquiera al inducir la fosforilación de RI. El experimento demuestra una elevada especificidad del ligante dual para IGF-1R fosforilado.

Con el fin de evaluar la influencia de la longitud del conector sobre el rendimiento de tinción se utilizaron las moléculas de conector 2xC18, 4xC18, 6xC18 y 8xC18 (conectores 11, 12, 13 y 14 del Ejemplo 2.4) en la configuración de ensayo IHQ. De los ligantes duales sometidos a ensayo, el que presentaba el conector más largo (8xC18) mostró los resultados de tinción superiores (fig. 13C). Lo anterior indica que por lo menos en este caso un conector flexible largo facilita la unión simultánea de ambos brazos de ligante dual a los dos epítomos diferentes en pIGF-1R.

El ligante dual compuesto de Fab'_ss 1.4.168, Fab'_ss 30.4.33 y una molécula de conector 8xC18 (el conector 14 del Ejemplo 2.4) se sometió a ensayo adicionalmente en tejido de xenoinjerto H322M FFIP. Datos del protocolo Benchmark: el pretratamiento se realizó con tampón de acondicionamiento celular 1 (AC1), el tiempo de incubación de la molécula ligante fue de 32 min. y la temperatura de incubación, de 25°C. Nuevamente no se observó tinción de pIGF-1R con una molécula de detección compuesta del conector 8xC18 y únicamente uno de entre Fab'_ss 1.4.168 y Fab'_ss 30.4.33. La detección con la molécula ligante dual completa (que consiste de ambos fragmentos Fab'_ss + conector 8xC18), sin embargo, condujo a una tinción de la membrana característica de pIGF-1R.

2.10 Ligante dual de ensayo Biacore sobre la superficie del sensor

Con el fin de obtener datos cinéticos también para la versión optimizada del ligante dual anti-pIGF-1R del Ejemplo 2.9, se llevó a cabo un experimento Biacore adicional.

Se utilizó un aparato Biacore 3000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore SA montado en el sistema a T=25°C. Se llevó a cabo el preacondicionamiento a 100 µl/min. con 3x inyecciones de 1 min. de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y de 1 min. con HCl 10 mM.

Como tampón del sistema se utilizó HBS-ET (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,05%). El tampón para muestras era el tampón del sistema.

Se reguló el sistema BIAcore 3000 utilizando el programa de control V4.1.

Se capturaron 89 UR de amino-PEO-biotina sobre la celda de flujo de referencia 1. Se capturaron 594 UR de 8xC18 biotinilado-conector (I) (5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(espaciador C18)4-(Biotina-dT)-(espaciador C18)4-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3')=(conector 14 del Ejemplo 2.4).

Se inyectaron 300 nM de Fab'_ss 30.4.33 y 300 nM de Fab'_ss 1.004.168 en el sistema a un caudal de 50 µl/min. durante 3 min. Como control únicamente se inyectaron 300 nM de Fab'_ss 30.4.33 o 300 nM de Fab'_ss 1.004.168, respectivamente, para someter a ensayo la contribución cinética de cada Fab'_ss. Se inyectó el péptido IGF-1R(1340-1366)[1346-pTyr]amida (el péptido fosforilado en la tirosina 1346 de SEC ID nº 11=analito sintético) en el sistema a un caudal de 50 µl/min. durante 4 min., libre en solución, en etapas de concentración de 0 nM, 0,4 nM, 1,1 nM, 3,3 nM (dos veces), 10 nM y 30 nM. Se monitorizó la disociación a un caudal de 50 µl/min. durante 5,3 min. Se regeneró el sistema tras cada etapa de concentración con un pulso de 12 s de NaOH 250 mM y se recargó con ligando de Fab'_ss.

Como controles adicionales, a) se inyectó tampón en lugar de los Fab'_ss y b) se utilizó una celda de flujo en la que se inmovilizó amino-PEO-biotina (datos no mostrados). En dichos experimentos se observó unión no específica del "analito".

La figura 15 indica esquemáticamente la configuración del ensayo en el aparato Biacore. La tabla proporcionada en la figura 16 muestra los resultados de la cuantificación obtenidos con este enfoque. Las figuras 17, 18 y 19 ilustran los resultados del Biacore de dicha configuración de ensayo.

Tal como se observa en la figura 16, la molécula ligante dual muestra una afinidad de ~10 pM para el analito sintético fosforilado IGF-1R. Lo anterior constituye una mejora de la afinidad de 200 o 300 veces respecto a una molécula ligante que consiste de Fab'_ss 30.4.33 o Fab'_ss 1.4.168 por sí solos. Las tasas de disociación determinadas eran de 830 min. para el ligante dual, de 7,3 min. para el ligante monovalente Fab'_ss 30.4.33 y de 3,5 min. para el ligante monovalente Fab'_ss 1.4.168. Estos datos demuestran claramente el efecto de unión cooperativa de la molécula de ligante dual utilizada.

25 Ejemplo 3

Agente ligante bivalente a HER3 fosforilado

La familia de los receptores tirosina quinasa de las proteínas HER consisten de cuatro elementos: HER1, HER2, HER3 y HER4. Tras la unión del ligando, los receptores se dimerizan como homodímeros o heterodímeros de diversas maneras, induciendo diferentes rutas de transducción de señales dependiendo del ligando y de los niveles de expresión de cada uno de los cuatro elementos de la familia. Por ejemplo, HER3 experimenta un cambio conformacional al unirse a sus ligandos neuregulina-1 (NRG1) o neuregulina-2 (NRG2) y el dominio de dimerización de HER3 queda expuesto y puede interactuar con otros receptores de HER. Tras la dimerización, HER3 es fosforilado. En el presente ejemplo, los presentes inventores desarrollaron un ligante dual para detectar la forma fosforilada de HER3.

3.1 Desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAb 7.2.32 y mAb 4.1.15)

40 a) Inmunización de ratones:

Se inmunizaron ratones Balb/c y NMRI con HER3(1243-1267)[KLH-MP-Cys-UZU-1243]amida o pHER3(1283-1295)[pTyr1289; KLH-MP-Cys-UZU-1283]amida. La dosis de inmunización inicial fue de 100 µg. Los ratones se inmunizaron adicionalmente con 100 µg del inmunógeno tras 6 y 10 semanas.

45 b) Fusión y clonación:

Las etapas de fusión y de clonación se llevaron a cabo tal como se indica en 2.1 b).

50 c) Aislamiento de inmunoglobulinas a partir de sobrenadantes de cultivo celular

Se llevó a cabo el aislamiento de inmunoglobulinas tal como se indica en 2.1 c).

55 d) Caracterización biofísica de anticuerpos monoclonales

Se investigaron las propiedades cinéticas de la interacción entre los anticuerpos monoclonales y HER3 o la forma fosforilada de pHER3 mediante cribado cinético de resonancia del plasmón superficial utilizando la tecnología Biacore™.

Se utilizó un aparato Biacore™ A100 bajo el control de la versión de software V1.1. Se montó un chip Biacore™ CM5 en el aparato y se acondicionó hidrodinámicamente siguiendo las instrucciones del fabricante. A modo de tampón de migración se utilizó un tampón HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05% (p/v)). Se inmovilizó un anticuerpo policlonal de conejo de captura anti-Fc de IgG de ratón a una concentración de 30 µg/ml en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) en los puntos 1, 2, 4 y 5 en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4 a 10.000 RU. El anticuerpo se inmovilizó covalentemente mediante una reacción de NHS/EDC. A continuación, se desactivó el

sensor con una solución 1 M de etanolamina. Los puntos 1 y 5 se utilizaron para la determinación, y los puntos 2 y 4 se utilizaron a modo de referencia. Previamente a la aplicación en el chip sensor, los sobrenadantes de hibridoma que contenían mAb se diluyeron 1:2 en tampón HBS-EP. La solución diluida se aplicó a un caudal de 30 µl/min. durante 1 min. Inmediatamente después el analito HER3(1242-1267)_humano-Bi-PEG-amida (SEC ID nº 17), pHER3(1283-1295[pTyr1289]) humano-PEG2-EDA-Btn (SEC ID nº 18) o HER3(1283-1295)_humano-PEG2-EDA-Btn (SEC ID nº 18), injertados individualmente sobre estreptavidina, se inyectó a un caudal de 30 µl/min. durante 2 min. Después, se registró la señal durante un tiempo de disociación de 5 min. Se regeneró el sensor mediante la inyección de una solución de glicina-HCl 10 mM (pH 1,7) durante 2 min. a un caudal de 30 µl/min. Se calculó la constante de tasa de disociación k_d (1/s) según un modelo de Langmuir utilizando el software de evaluación siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos monoclonales seleccionados interactuaron con el epítipo HER3 que comprendía los aminoácidos 1242-1267 o con el epítipo HER3 fosforilado (pTyr1289) que comprendía los aminoácidos 1283-1295 con una constante de tasa de disociación comprendida dentro de los límites de la reivindicación de patente. Los anticuerpos que se unían a la forma no fosforilada del epítipo HER3(1283-1295) se rechazaron para estudios posteriores.

El anticuerpo seleccionado dirigido contra HER3(1242-1267) se denominó 7.2.32 (cadena pesada de región variable mostrada en SEC ID nº 21 y cadena ligera de región variable mostrada en SEC ID nº 22, respectivamente) y se determinó que su constante de tasa de disociación era de $2,3 \times 10^{-3}$ 1/s y, en consecuencia, que se encontraba dentro del intervalo necesario para el enfoque de ligante dual. El anticuerpo seleccionado dirigido contra HER3(1283-1295[pTyr1289]) se denominó 4.1.15 (cadena pesada de región variable mostrada en SEC ID nº 23 y cadena ligera de región variable mostrada en SEC ID nº 24, respectivamente) y se determinó que su constante de tasa de disociación era de $2,5 \times 10^{-3}$ 1/s y, de esta manera, que se encontraba dentro del intervalo necesario para el enfoque de ligante dual.

e) Secuenciación de regiones variables de los anticuerpos seleccionados

Se secuenciaron las regiones variables de los anticuerpos seleccionados utilizando métodos estándares de biología molecular. Se muestran las secuencias en SEC ID nº 21 a nº 24.

3.2 Desarrollo de un ligante dual que reconoce HER3 fosforilado (pTyr1289)

a) Expresión recombinante de proteínas de fusión de Fab

Se expresaron los fragmentos Fab 7.2.32 y 4.1.15 en células Hek293F en forma de proteínas de fusión que portaban una etiqueta 8xHis y una secuencia de reconocimiento de corte de sortasa (SEC ID nº 16). Se transfectó 1 l con 1×10^6 células HEK 293/ml con una viabilidad >90% en una proporción 1:1 con los plásmidos codificantes de la cadena pesada y la cadena ligera de 7.2.32 o 4.1.15 utilizando el reactivo de transfección 293fectin™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la transfección, se incubaron las células HEK293F durante 7 días a 130 rpm, 37°C y 8% de CO₂. A continuación, se centrifugaron las células a 4°C, a 8.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante, que contenía la proteína recombinante, se filtró adicionalmente utilizando un sistema de filtración de vacío Steriflip de 0,22 µm (Millipore). Se purificaron los fragmentos Fab mediante cromatografía de columna de afinidad de níquel y filtración en gel preparativa utilizando el sistema FPLC ÄKTA explorer, utilizando métodos de purificación estándares. Se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE y filtración en gel analítica.

b) Conjugación de oligo de ADN utilizando el enzima sortasa en una reacción de transpeptidasa

El enzima sortasa es un enzima proteolítico procariótico que también presenta actividad de transpeptidasa (Ton-That et al., PNAS, 1999). En la presente memoria el enzima cataliza una reacción de transpeptidasa entre un motivo de corte de sortasa LPXTG y un residuo de glicina que se encuentra unido a un oligo de ADN. Se utilizaron oligos 17-mero (oligo para el marcaje de 4.1.15 mostrado en SEC ID nº 25) y 19-mero (oligo para el marcaje de 7.2.32 mostrado en SEC ID nº 26) para la reacción de marcaje. El marcaje se llevó a cabo con sortasa recombinante 20 µM, fragmento Fab 50 µM y oligo 200 µM en un tampón de Tris 20 mM, pH 8, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, a 37°C durante la noche. A continuación, se diluyó la reacción de marcaje 10 veces en Tris 20 mM, pH 8,0, y se aplicó a una columna de intercambio iónico Resource Q (GE Healthcare) equilibrada en Tris 20 mM, pH 8,0. Los fragmentos oligo y oligo-Fab de carga fuertemente negativa se eluyeron con un gradiente salino elevado de Tris 20 mM, pH 8 y NaCl 1 M y de esta manera se separaron de la sortasa y de los fragmentos Fab no marcados, que eluían a una concentración salina baja. Se monitorizó la elución siguiendo la absorbancia a 495 nm, detectando el marcaje fluoresceína del oligo. Las fracciones eluidas que contenían oligo y Fab-oligo se agruparon y se separó el Fab-oligo del oligo no conjugado mediante filtración en gel preparativa en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) utilizando Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, como tampón de equilibrado y de migración. Se evaluó la pureza del producto final utilizando filtración en gel analítica y SDS-PAGE y únicamente se utilizó producto final de pureza >90% en el ensamblaje de los ligantes duales. A continuación un Fab-oligo se denomina "Fab_ss".

c) Ensamblaje de un ligante dual anti-HER3

El ligante dual anti-pHER3 se basa en una molécula de conector de ADNss y dos fragmentos Fab_ss con diana en

epítomos diferentes del dominio intracelular de HER3: Fab_ss 4.1.15 detecta un sitio de fosforilación (pTyr 1289) y Fab_ss 7.2.32, un sitio no fosforilado de dicha proteína diana. Se llevó a cabo la evaluación del ensamblaje tal como se indica en 2.5.B. Los experimentos demostraron un ensamblaje eficiente de la molécula de ligante dual.

5 3.3 Evaluación de una molécula ligante dual anti-pHER3 en experimentos inmunohistoquímicos (IHQ):

Los experimentos IHQ se llevaron a cabo en la plataforma BenchMark XT de Ventana. Para el ensayo, se utilizó un ligante dual anti-pHER3 que consistía de Fab_ss 7.2.32 (ligante de un epítipo no fosforilado del dominio intracelular de HER3), Fab_ss 4.1.14 (ligante del fosfoepítipo pTyr1289 del dominio intracelular de HER3) y un conector flexible. En el presente ensayo se utilizó un conector flexible con un espaciador 4XC18 (=conector 12 del Ejemplo 2.4). Un marcaje de biotina dentro de la molécula de detector sirvió como etiqueta de detección para el kit de detección iVIEW DAB de Ventana basado en estreptavidina.

Con el fin de someter a ensayo la especificidad de la molécula de ligante dual anti-pHER3, se utilizó un sofisticado sistema de ensayo basado en células Hek293 fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFIP). Las células Hek293 habían sido transfectadas transitoriamente con vectores de expresión tanto de HER2 como de HER3. En un caso, se utilizó un vector de expresión de HER3 que codificaba una versión mutada de HER3, en el que 14 tirosinas del dominio intracelular que sirven de sitios de fosforilación habían sido sustituidas por fenilalaninas (Y975F, Y1054F, Y1132F, Y1159F, Y1197F, Y1199F, Y1222F, Y1224F, Y1260F, Y1262F, Y1276F, Y1289F, Y1307F, Y1328F). Las células se fijaron con formalina y se incluyeron en parafina siguiendo protocolos estándares. Antes de la fijación las células fueron estimuladas con NRG1-β1 20 nM (Preprotech) durante 15 min. a 37°C para inducir la fosforilación de HER3 o se dejaron sin tratar. Los experimentos de transferencia western (fig. 20 A) demostraron la estimulación con éxito de la fosforilación del receptor.

Para la detección se utilizó 1 µg/ml por fragmento Fab_ss de sólo Fab_ss 7.2.32 o sólo Fab_ss 4.1.15, respectivamente, y una cantidad equimolar de conector 4xC18, así como una mezcla de ambos fragmentos Fab_ss de Fab_ss 7.2.32 y Fab_ss 4.1.15 (ambos a una concentración de 1 µg/ml) y una cantidad equimolar de conector 4xC18, respectivamente. Un marcaje de biotina dentro de la molécula de detector sirvió como etiqueta de detección para el kit de detección iVIEW DAB de Ventana basado en estreptavidina. Datos del protocolo Benchmark: el pretratamiento se realizó con tampón de acondicionamiento celular 1 (AC1), el tiempo de incubación de la molécula de unión fue de 32 min. y la temperatura de incubación, de 37°C.

Una molécula de detección compuesta de una molécula de conector 4xC18 (el conector 12 del Ejemplo 2.4) y únicamente Fab_ss 7.2.32 o únicamente Fab_ss 4.1.15 no generó tinción en ninguno de los pellets celulares FFIP sometidos a ensayo (fig. 20B, filas 1 y 2). En contraste, la detección con la molécula ligante dual completa (que consistía de ambos fragmentos Fab_ss + conector 4xC18) condujo a tinción, pero sólo sobre células que habían sido estimuladas con NRG1-β1 y que expresan HER3 de tipo salvaje (fig. 20B, fila 3). No se observó tinción sobre las células estimuladas con NRG1-β1 que sobreexpresaban la versión mutada de HER3 sin el sitio de fosforilación Tyr1289. El experimento demuestra la elevada especificidad del ligante dual para HER3 fosforilado.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG

45 <120> Detección de un polipéptido modificado post-traduccionalmente mediante un agente ligante bivalente

<130> 27204 WO-WN

<150> EP10196687.7

50 <151> 2010-12-23

<150> EP11173832.4

<151> 2011-07-13

55 <160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

60 <211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

65 <400> 1

ES 2 605 493 T3

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

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

Asp Tyr Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg Val Lys Thr Asp Leu Trp Trp Gly Leu Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 2
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

5

ES 2 605 493 T3

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
 35 40 45

Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Thr Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

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

Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ser Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 100 105 110

Thr Val Leu Gly
 115

5 <210> 3
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

ES 2 605 493 T3

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

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

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Leu Asn Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Val Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

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

<210> 5

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> ADNss 19-mero
 <400> 5
 agtctattaa tgcttctgc 19
 10 <210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> ADNss 17-mero
 <400> 6
 20 agttctatcg tcgtcca 17
 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNss 19-mero complementario
 30 <400> 7
 gcagaagcat taatagact 19
 <210> 8
 <211> 17
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNss 17-mero complementario
 40 <400> 8
 tggacgacga tagaact 17
 <210> 9
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido sintético
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(17)
 55 <223> bAla
 <400> 9

ES 2 605 493 T3

Glu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Ile Arg Ala Glu Arg Glu Lys Glu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Ser Leu Lys Asp Arg Ile Glu Lys Arg Arg Arg Ala Glu Arg Ala
 20 25 30

Glu

5 <210> 10
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(17)
 <223> ácido amino-trioxa-octanoico (X representa ácido amino-trioxa-octanoico)

<400> 10

Ser Leu Lys Asp Arg Ile Glu Arg Arg Arg Ala Glu Arg Ala Glu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Glu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Ile Arg Ala Glu Arg Glu Lys Glu
 20 25 30

20 <210> 11
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 11

Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg Lys Asn
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr
 20 25

30 <210> 12
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

40 <400> 12

ES 2 605 493 T3

Tyr Glu Glu His Ile Pro Tyr Thr His Met Asn Gly Gly Lys Lys Asn
 1 5 10 15

Gly Arg Ile Leu Thr Leu Pro Arg Ser Asn Pro Ser
 20 25

5 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético (espaciador)
 <400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

15 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> HA-Tag
 <400> 14

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

25 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Etiqueta Avi
 <400> 15

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 1 5 10 15

35 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> etiqueta de corte de sortasa
 <400> 16

Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 1 5 10

45 <210> 17
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55

ES 2 605 493 T3

<220>
<221> misc_feature
<223> HER3 (1242-1267) humana

5 <400> 17

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

Glu Asp Tyr Glu Tyr Met Asn Arg Gln Arg
20 25

10 <210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <220>
<221> misc_feature
<223> HER3 (1283-1295) humana

20 <400> 18

Pro Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg Ala Phe
1 5 10

25 <210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <220>
<221> misc_feature
<223> VH (mAb 30.4.33)

<400> 19

ES 2 605 493 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ile Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Asp Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Lys Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ser Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Ser Thr Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg His Gly Tyr Tyr Arg Ser Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> VL (mAb 30.4.33)

15 <400> 20

ES 2 605 493 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu
 65 70 75 80

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

Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VH (mAb 7.2.32)

10

<400> 21

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

Lys Gly Ser Leu Gln Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
 20 25 30

ES 2 605 493 T3

Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Glu Ser Ser Asp Tyr Ala Thr Asp Tyr
 50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln
 65 70 75 80

Asn Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
 85 90 95

Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Ser Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser
 115 120

<210> 22
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL (mAb 7.2.32)

10

<400> 22

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

Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asp Asn
 20 25 30

Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

His Val Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

ES 2 605 493 T3

<210> 23
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VH (mAb 4.1.15)

10

<400> 23

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

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

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

Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly
 50 55 60

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

Ala Phe Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr
 85 90 95

Phe Cys Ala Arg Ser Arg Gly Leu Arg Gln Gly Ala Gly Phe Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

15

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL (mAb 4.1.15)

<400> 24

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

25

Gln Lys Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

8. Método de tinción histológica, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 a) proporcionar una muestra de células o de tejido,
b) incubar dicha muestra con un agente ligante bivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,
y
c) detectar el agente ligante bivalente, tiñendo de esta manera dicha muestra para un polipéptido diana fosforilado post-traduccionalmente.
- 10 9. Utilización de un agente ligante bivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la tinción de una muestra de células o de tejido.

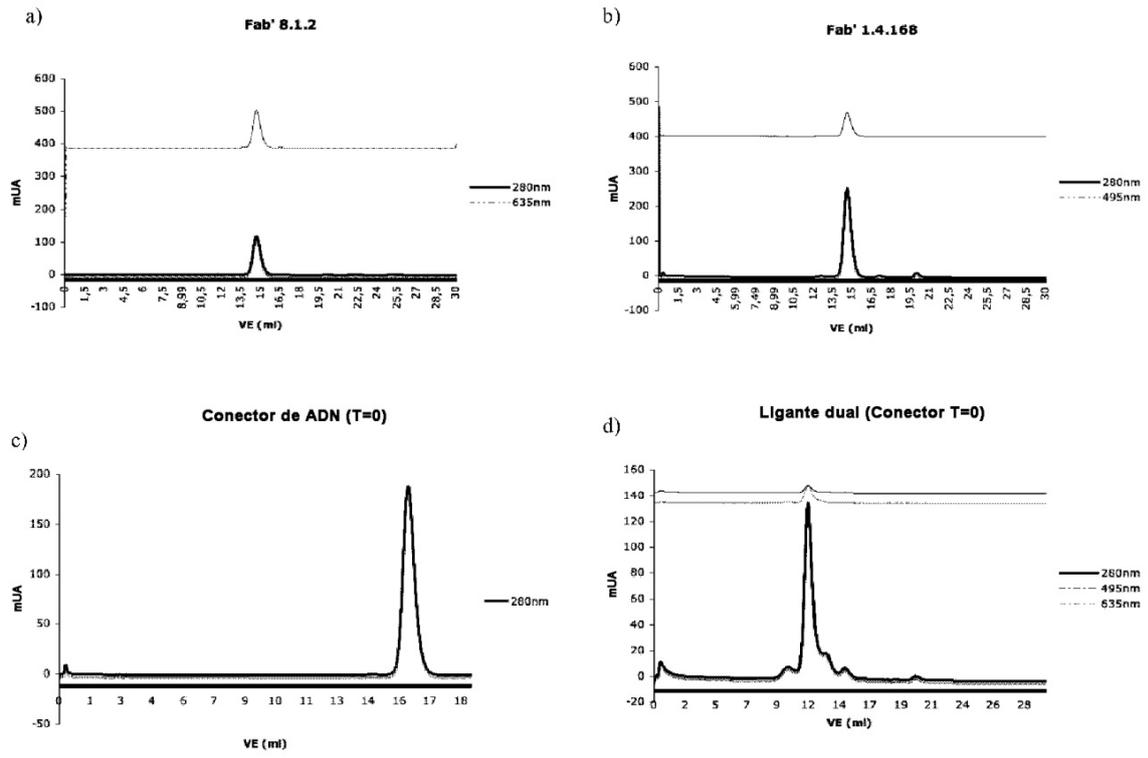


Fig. 2

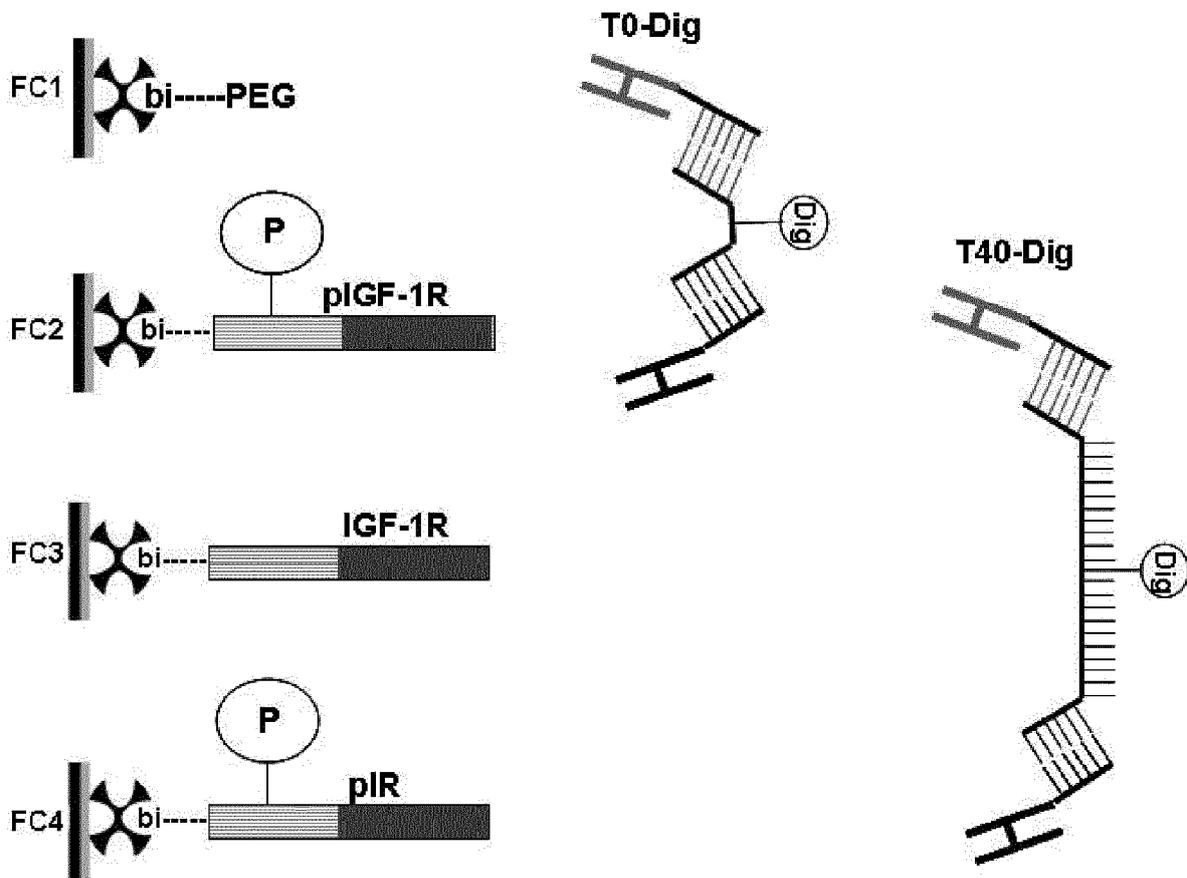


Fig. 3

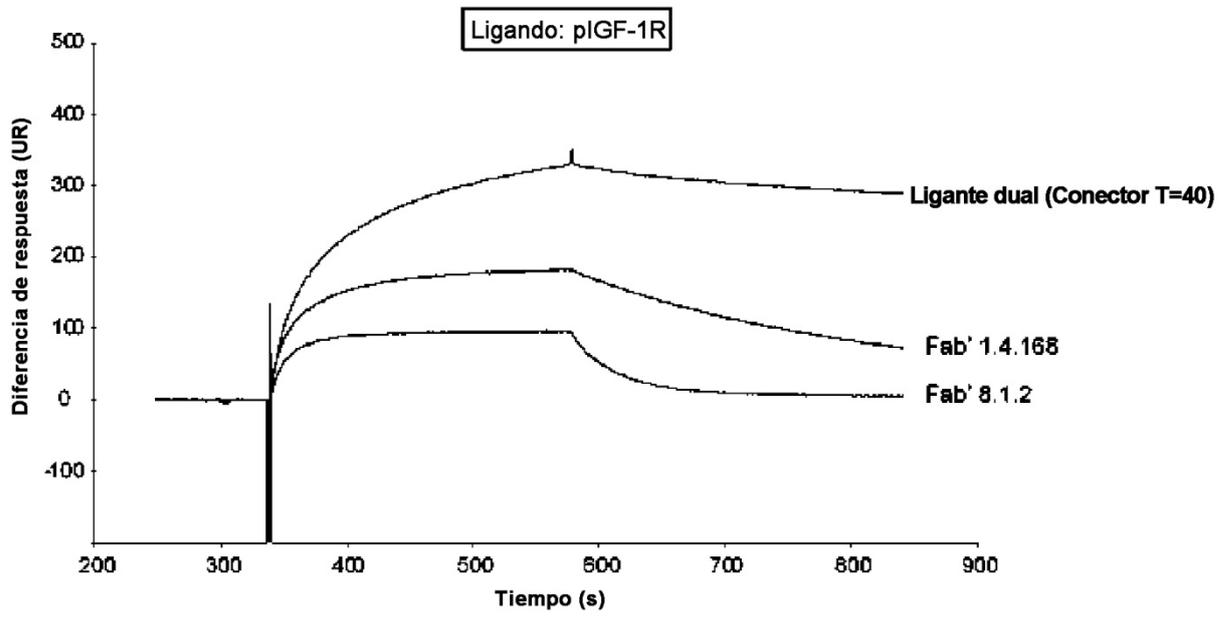


Fig. 4

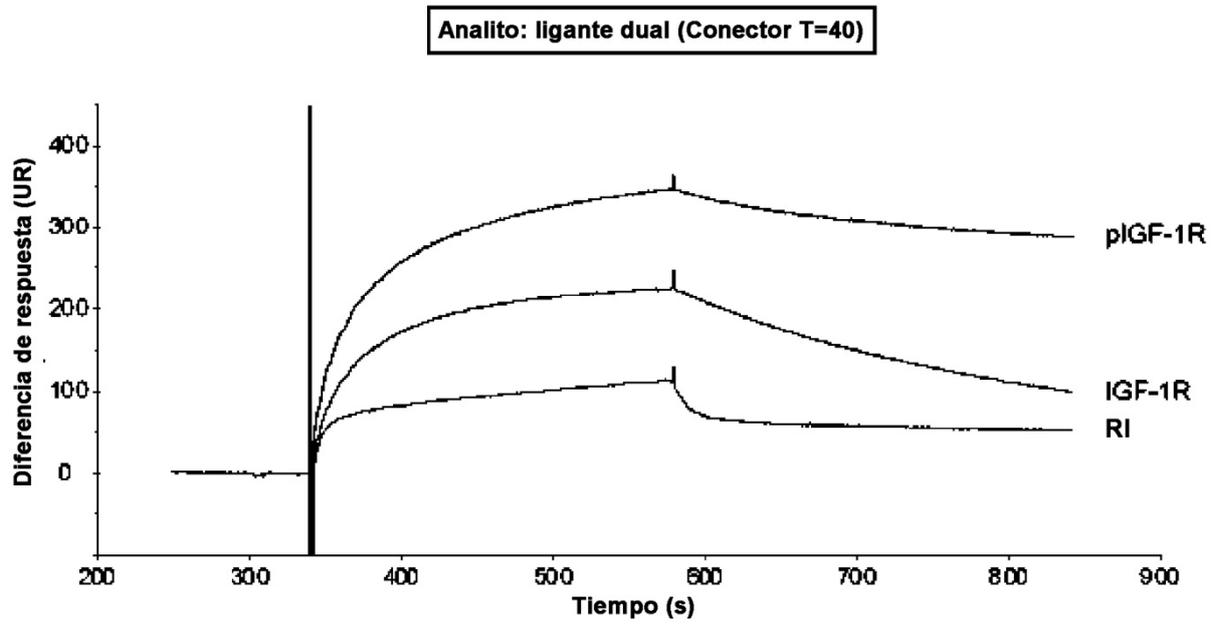


Fig. 5

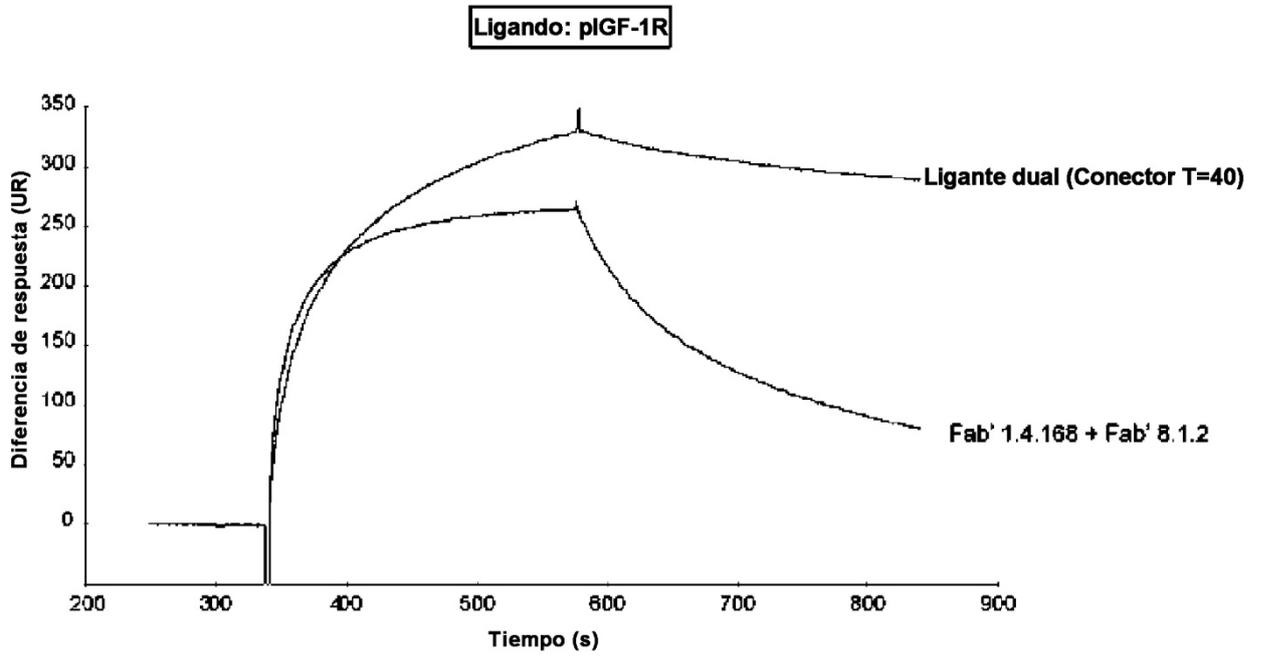


Fig. 6

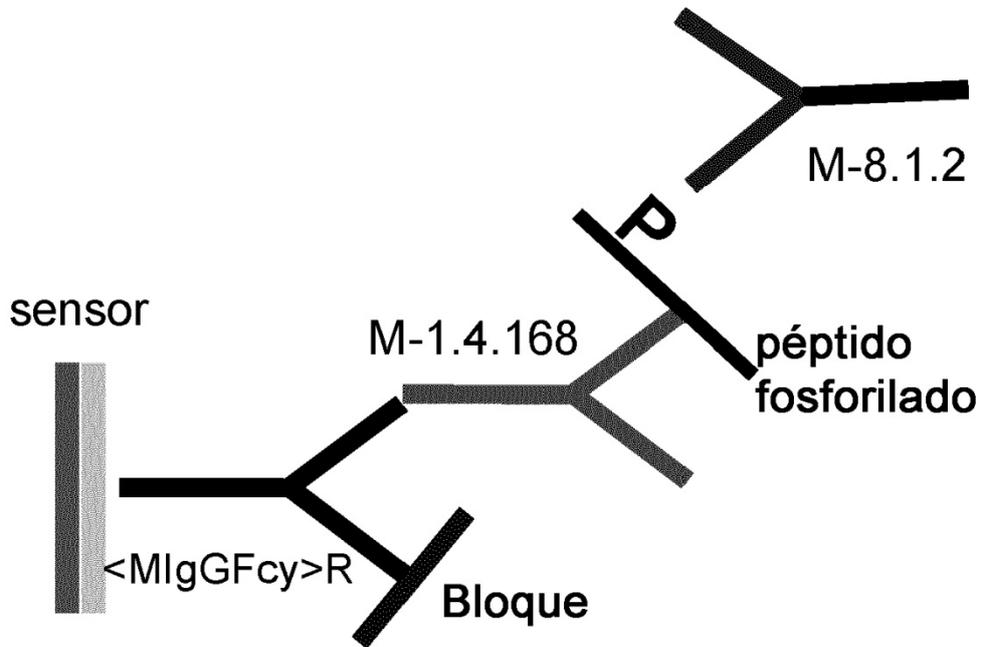


Fig. 7

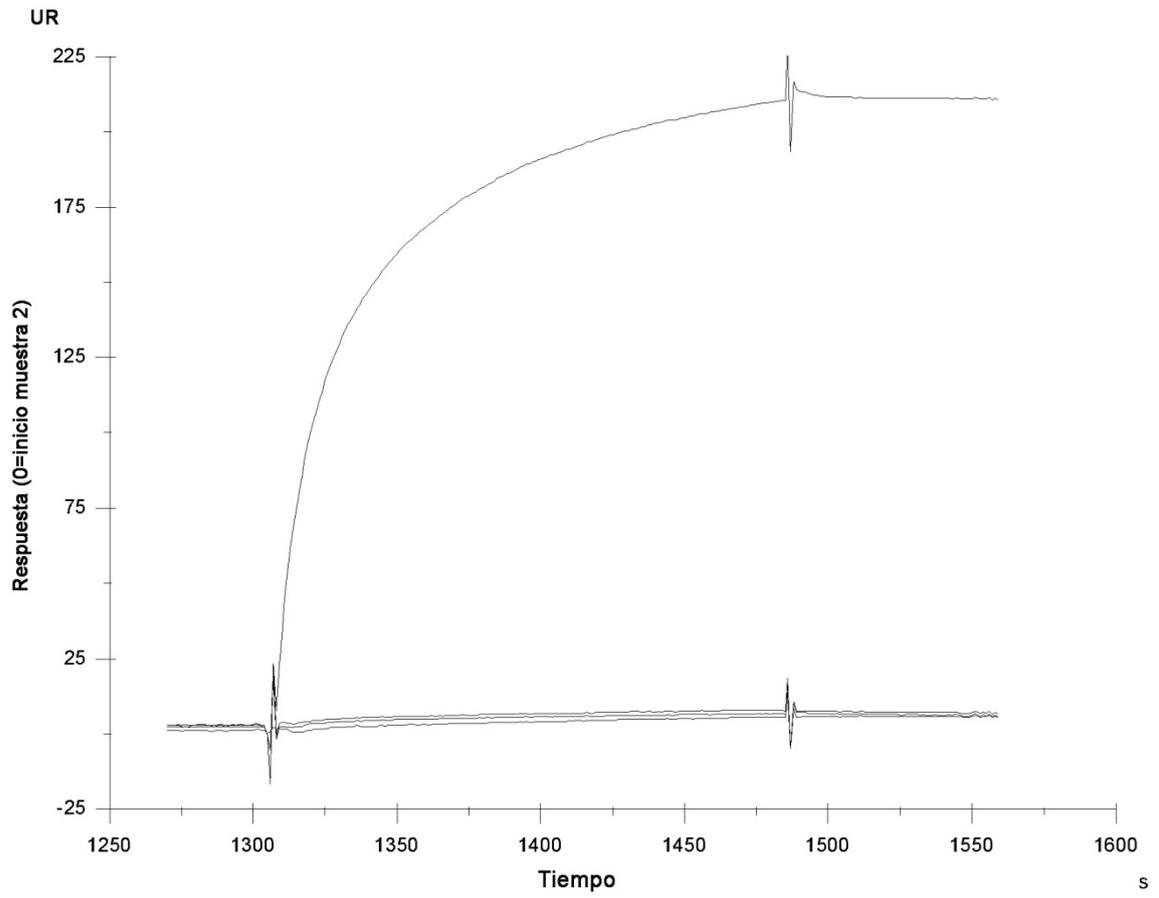


Fig. 8

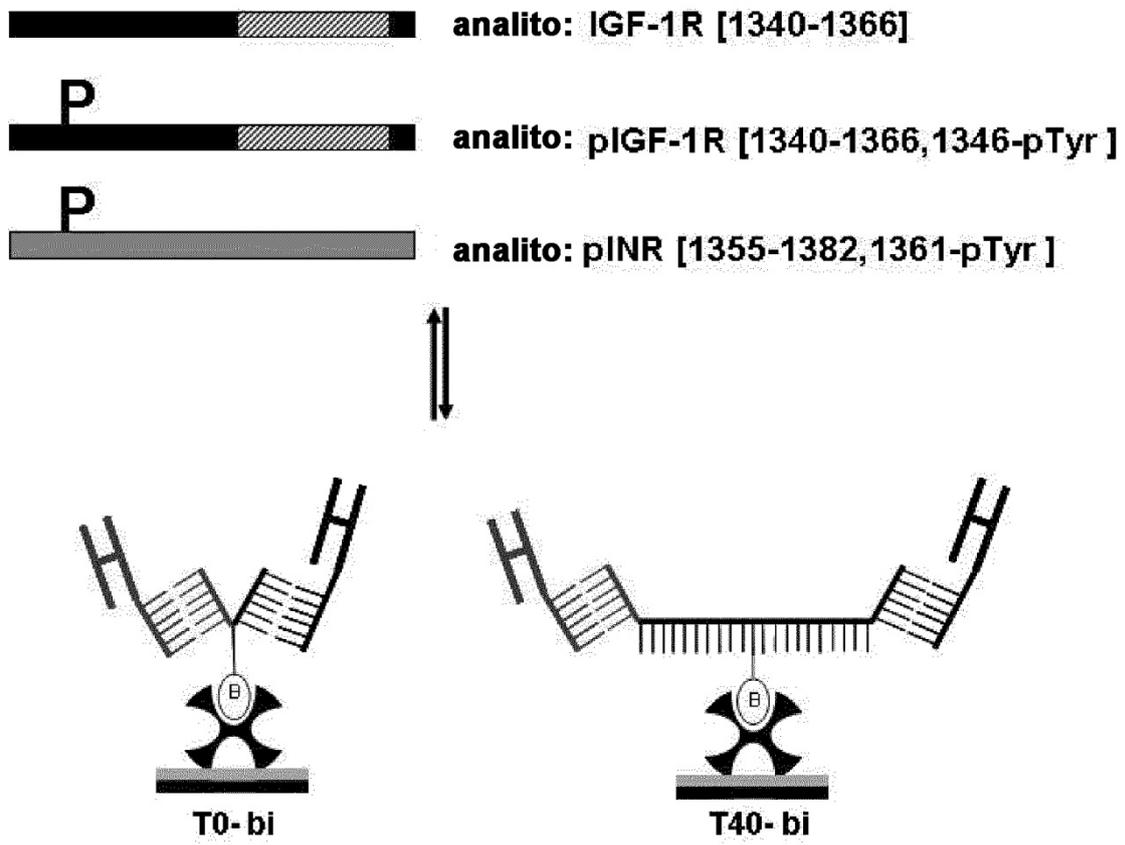


Fig. 9

Conector	Analito	Fab_ss 1	Fab_ss 2	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 dis (min)	KD (M)	KD (nM)
T40	pIGF-1R	8.1.2	1.4.168	2,24E+06	2,79E-05	414	1,25E-11	0,01
		8.1.2	-	1,17E+06	2,21E-02	0,5	1,89E-08	19
		-	1.4.168	1,96E+06	4,19E-03	3	2,14E-09	2
	pINR	8.1.2	1.4.168	1,57E+06	3,70E-02	0,3	2,36E-08	24
		8.1.2	-	1,36E+06	4,45E-02	0,3	3,27E-08	33
		-	1.4.168	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	IGF-1R	8.1.2	1.4.168	2,73E+06	2,66E-03	4,3	9,73E-10	1
		8.1.2	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
		-	1.4.168	3,30E+06	3,62E-03	3	1,10E-09	1
T0	pIGF-1R	8.1.2	1.4.168	1,75E+06	6,01E-05	192	3,44E-11	0,03
		8.1.2	-	1,03E+06	2,22E-02	1	2,15E-08	22
		-	1.4.168	1,12E+06	2,91E-03	4	2,59E-09	3
	pINR	8.1.2	1.4.168	1,70E+06	4,18E-02	0,3	2,46E-08	25
		8.1.2	-	1,09E+06	4,83E-02	0,2	4,41E-08	44
		-	1.4.168	n.d	n.d.	n.d	n.d.	n.d.
	IGF-1R	8.1.2	1.4.168	1,98E+06	2,38E-03	5	1,20E-09	1
		8.1.2	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
		-	1.4.168	2,41E+06	3,26E-03	4	1,35E-09	1

Fig. 10

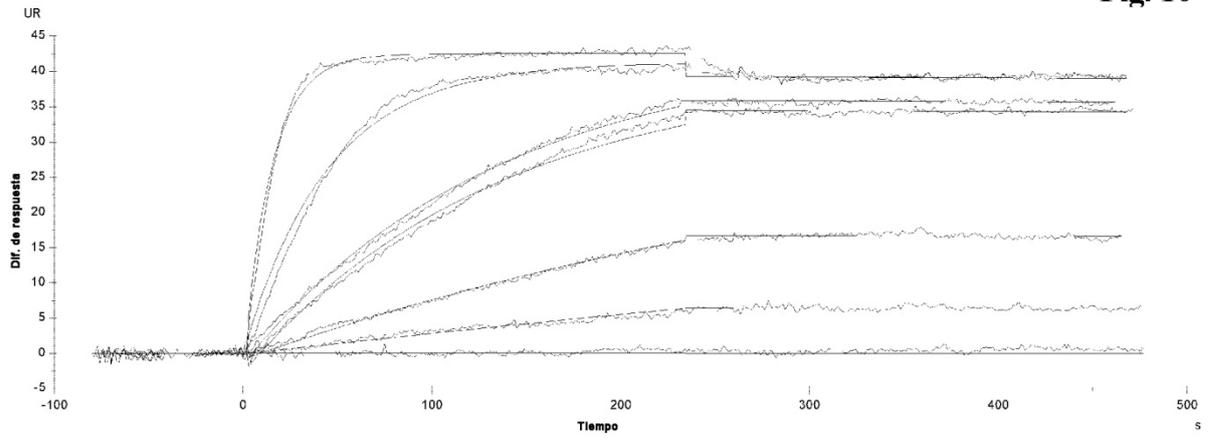


Fig. 11

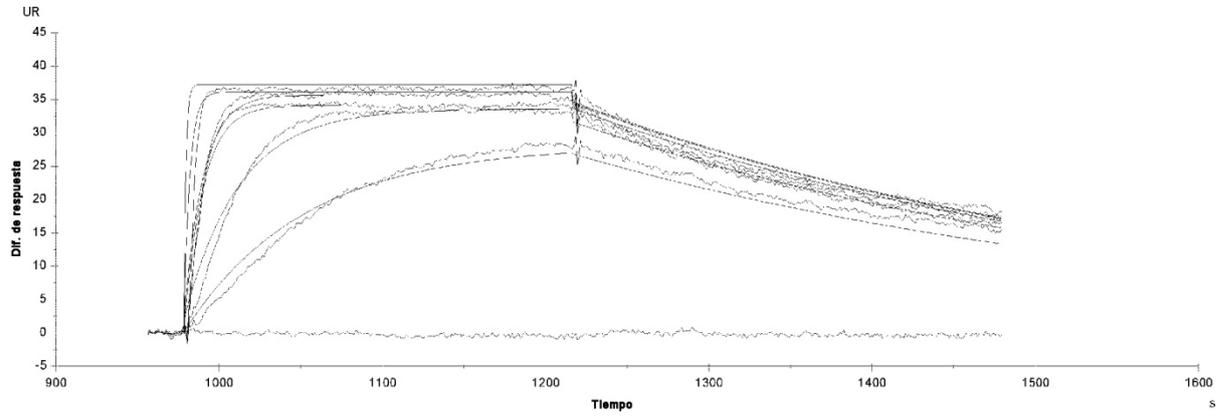


Fig. 12

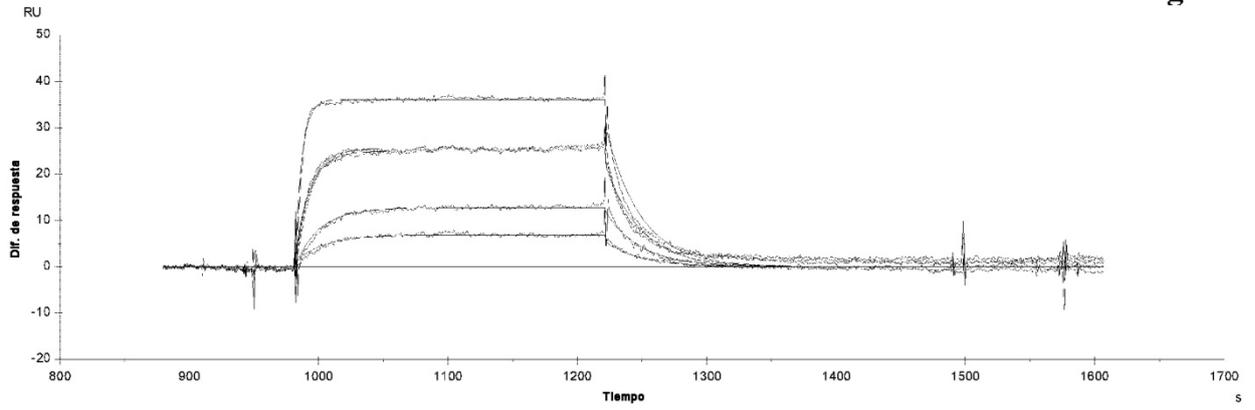


Fig. 13

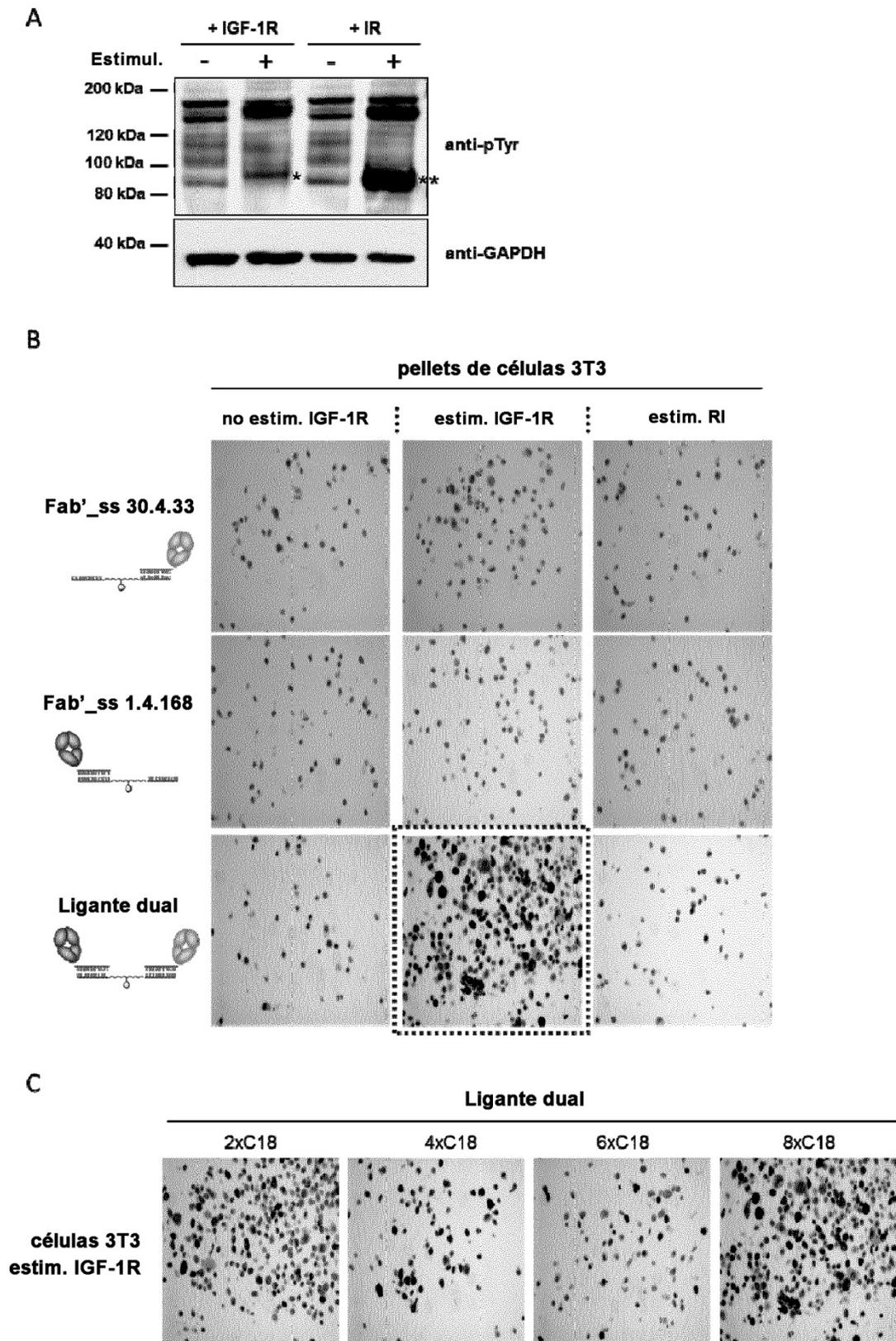


Fig. 14

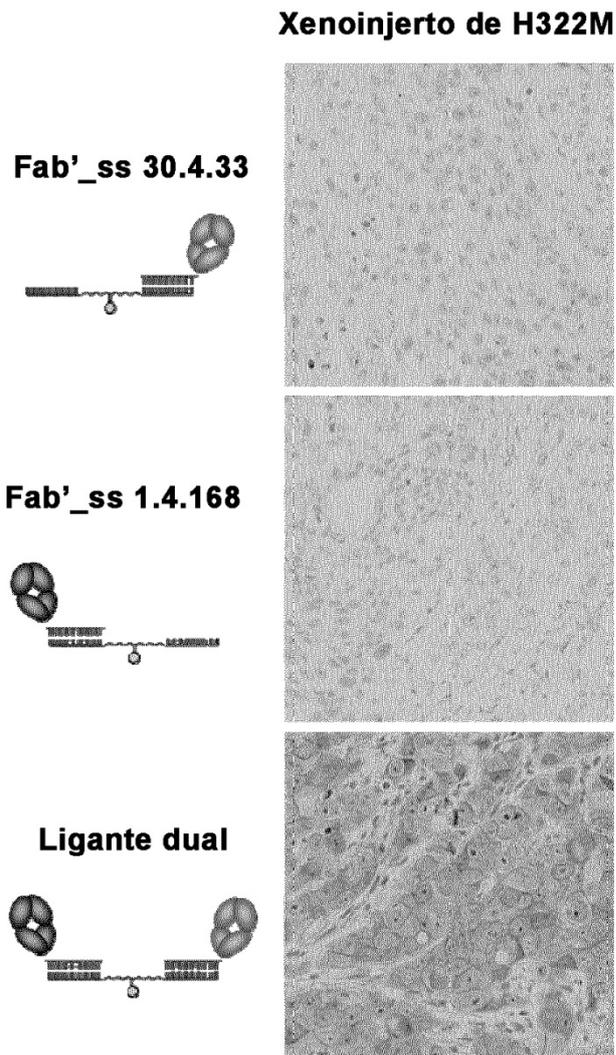


Fig. 15

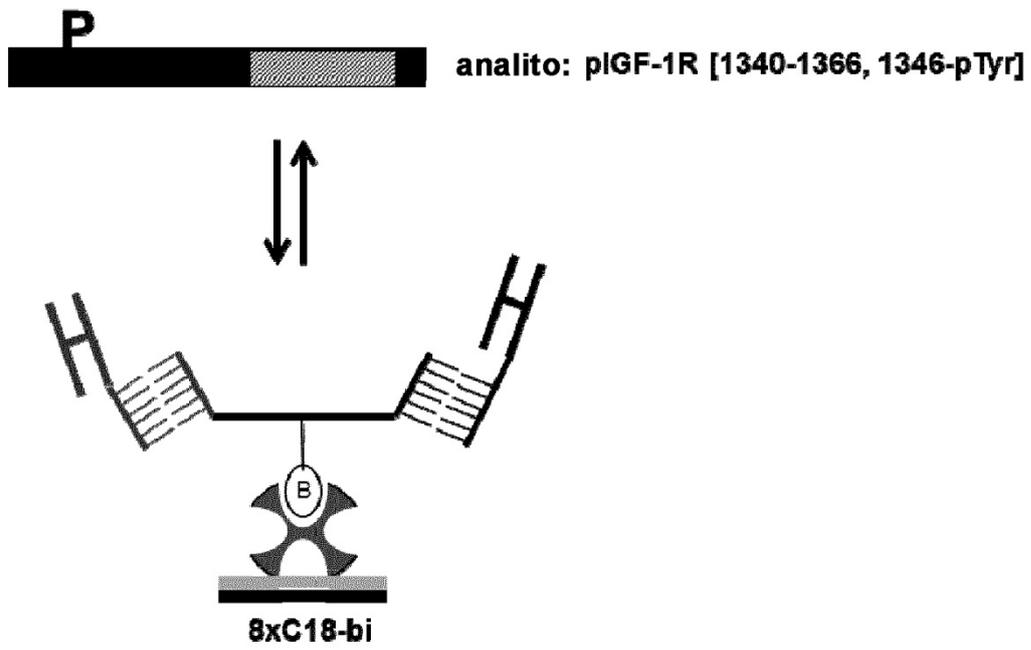


Fig. 16

Conector	Analito	Fab_ss 1	Fab_ss 2	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 dis (min.)	KD (M)	KD (nM)
HEG 8xC18	pIGF-1R	30.4.33	1.4.168	1.24E+06	1.39E-05	830	1.12E-11	0.011
		30.4.33	-	7.35E+05	1.57E-03	7.3	2.02E-09	2
		-	1.4.168	1.09E+06	3.22E-03	3.5	2.96E-09	3

Fig. 17

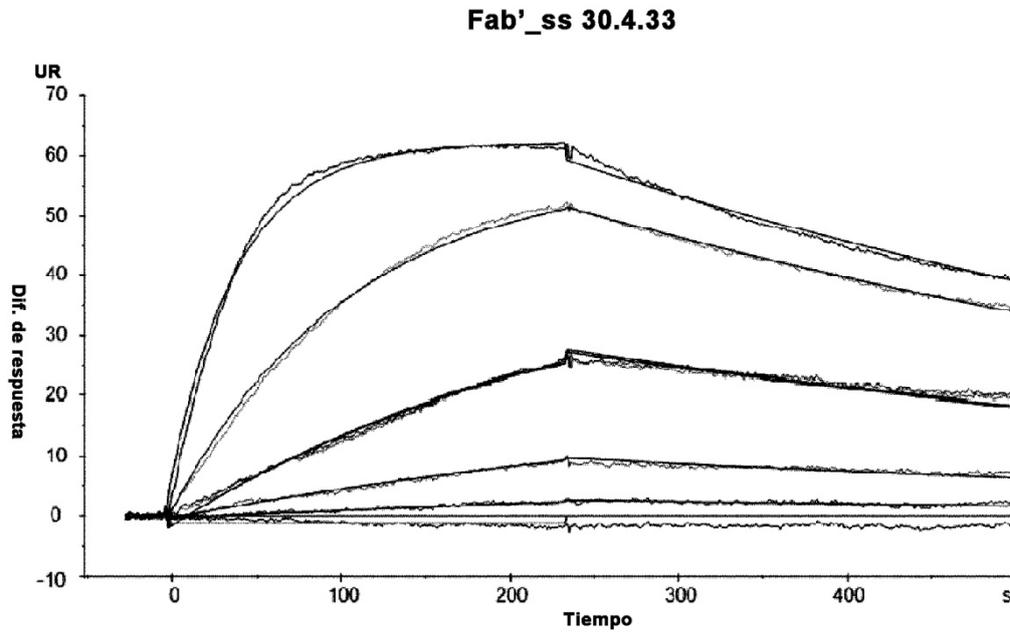


Fig. 18

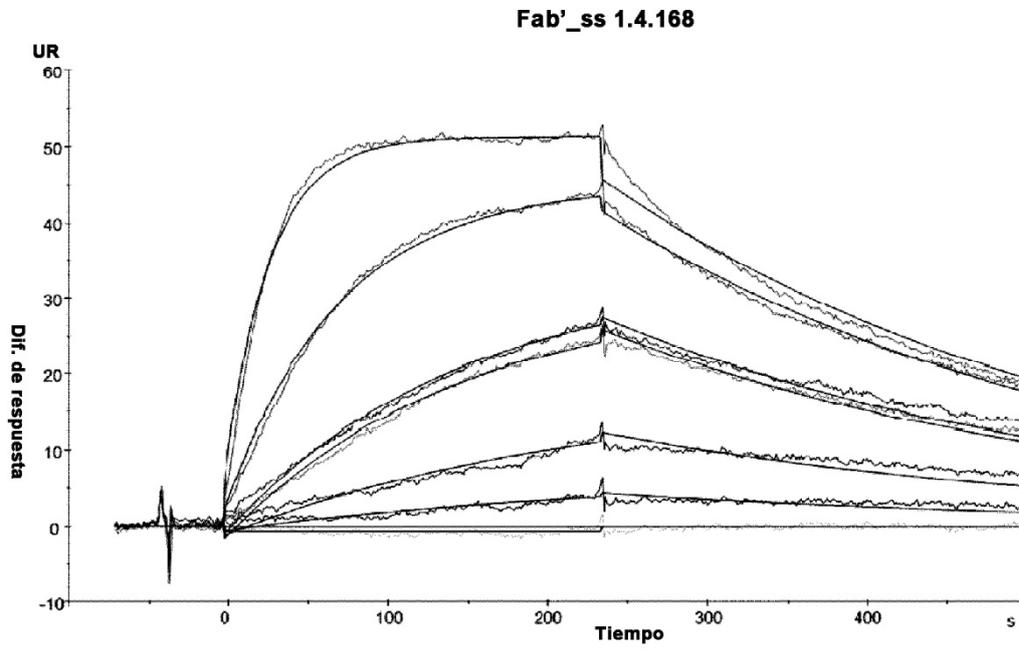


Fig. 19

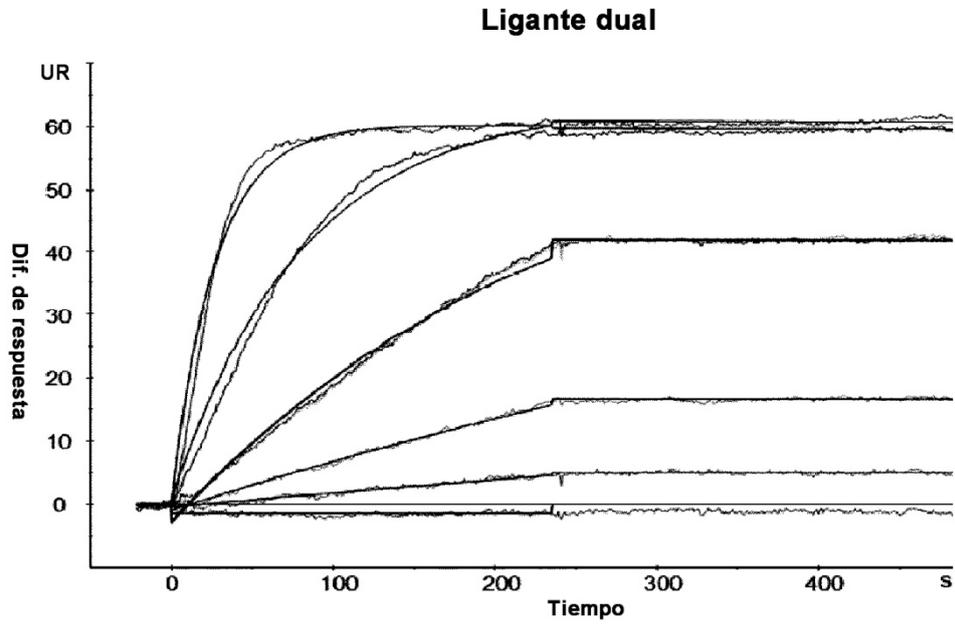
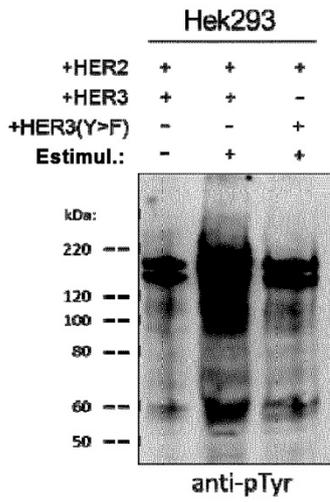


Fig. 20

A



B

pellets de células HEK293

