

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 353**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2008** **E 12168402 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2559702**

54 Título: **Dominios variables individuales de anticuerpos frente a albúmina sérica**

30 Prioridad:

08.02.2007 US 704832

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

08.08.2017

73 Titular/es:

**DOMANTIS LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**SCHON, OLIVER;
JESPERS, LAURENT;
HOLT, LUCY;
TOMLINSON, IAN y
CLUBE, JASPER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 629 353 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

Dominios variables individuales de anticuerpos frente a albúmina sérica

La presente invención se refiere a ligandos que comprenden un dominio variable individual de anticuerpos.

Introducción

5 El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo comprende dos regiones separadas: un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L : que puede ser V_K o V_λ). El sitio de unión a antígeno en sí está formado por seis lazos de polipéptidos: tres del dominio V_H (H1, H2 y H3) y tres del dominio V_L (L1, L2 y L3). Se produce un repertorio primario diverso de genes V que codifican los dominios V_H y V_L mediante la reordenación combinatoria de segmentos génicos. El gen V_H es producido por la recombinación de tres segmentos génicos, V_H , D

10 y J_H . En los seres humanos, existen aproximadamente 51 segmentos V_H funcionales (Cook y Tomlinson (1995) *Immunol. Today*, 16: 237), 25 segmentos D funcionales (Corbett *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.*, 268: 69) y 6 segmentos J_H funcionales (Ravetch *et al.* (1981) *Cell*, 27: 583), dependiendo del haplotipo. El segmento V_H codifica la región de la cadena de polipéptidos que forma los lazos de unión del antígeno primero y segundo del dominio V_H (H1 y H2), mientras que los segmentos V_H , D y J_H se combinan para formar el tercer lazo de unión a antígeno del dominio V_H

15 (H3). El gen V_L es producido por la recombinación de solo dos segmentos génicos, V_L y J_L . En los seres humanos, existen aproximadamente 40 segmentos V_K funcionales (Schäble y Zachau (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374: 1001), 31 segmentos V_λ funcionales (Williams *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220; Kawasaki *et al.* (1997) *Genome Res.*, 7: 250), 5 segmentos J_K funcionales (Hieter *et al.* (1982) *J. Biol. Chem.*, 257: 1516) y 4 segmentos J_λ funcionales (Vasicek y Leder (1990) *J. Exp. Med.*, 172: 609), dependiendo del haplotipo. El segmento V_L codifica la región de la cadena de polipéptidos que forma los lazos de unión a antígeno primero y segundo del dominio V_L (L1 y L2), mientras los segmentos V_L y J_L se combinan para formar el tercer lazo de unión a antígeno del dominio V_L (L3). Los anticuerpos seleccionados a partir de este repertorio primario son según se piensa suficientemente diversos para unirse a casi todos los antígenos con afinidad al menos moderada. Los anticuerpos de alta afinidad son

20 producidos por "maduración de afinidad" de los genes reordenados, en el que mutaciones se generan puntuales y

25 son seleccionados por el sistema inmunitario sobre la base de su unión mejorada.

El análisis de las estructuras y secuencias de anticuerpos ha demostrado que cinco de los seis lazos de unión a antígeno (H1, H2, L1, L2, L3) poseen un número limitado de conformaciones de cadena principal o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901; Chothia *et al.* (1989) *Nature*, 342: 877). Las conformaciones de cadena principal están determinadas por (i) la longitud del lazo de unión a antígeno, y (ii)

30 residuos particulares, o tipos de residuo, en determinadas posiciones clave en el lazo de unión a antígeno y la estructura principal del anticuerpo. El análisis de las longitudes del lazo y los residuos clave ha permitido predecir las conformaciones de cadena principal de H1, H2, L1, L2 y L3 codificadas por la mayoría de secuencias de anticuerpos humanos (Chothia *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinson *et al.* (1995) *EMBO J.*, 14: 4628; Williams *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en cuanto a secuencia, longitud y

35 estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de cadena principal para longitudes de lazo cortas que dependen de la longitud y de la presencia de residuos particulares, o tipos de residuo, en posiciones clave en el lazo y la estructura principal del anticuerpo (Martin *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai *et al.* (1996) *FEBS Letters*, 399: 1).

En la técnica son conocidos los anticuerpos biespecíficos que comprenden pares complementarios de regiones V_H y

40 V_L . Estos anticuerpos biespecíficos deben comprender dos pares de V_H y V_L , con cada par V_H/V_L uniéndose a un único antígeno o epítipo. Los métodos descritos implican hibridomas híbridos (Milstein & Cuello AC, *Nature* 305:537-40), minicuerpos (Hu *et al.*, (1996) *Cancer Res* 56:3055-3061), diacuerpos (Holliger *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-6448; documento WO-94/13804), anticuerpos recombinantes de quelación (CRAb; (Neri *et al.*, (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 367-373), biscFv (p. ej. Atwell *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 33, 1301-1312), anticuerpos

45 estabilizados de tipo "botón en ojal" (Carter *et al.*, (1997) *Protein Sci.* 6, 781-788). En cada caso cada especie de anticuerpo comprende dos sitios de unión a antígeno, cada uno adaptado mediante un par complementario de dominios V_H y V_L . Cada anticuerpo es capaz así de unirse a dos antígenos o epítopos diferentes al mismo tiempo, con la unión a CADA antígeno o epítipo mediada por un dominio V_H y su complementario V_L . Cada una de estas técnicas presenta sus propios inconvenientes; por ejemplo en el caso de hibridomas híbridos, los pares V_H/V_L

50 inactivos pueden reducir enormemente la fracción de IgG biespecífica. Además, la mayor parte de las estrategias biespecíficas dependen de la asociación de los diferentes pares V_H/V_L o de la asociación de cadenas V_H y V_L para recrear los dos sitios de unión V_H/V_L diferentes. Por tanto es imposible controlar la proporción entre sitios de unión a cada antígeno o epítipo en la molécula ensamblada y así muchas de las moléculas ensambladas se unirán a un antígeno o epítipo pero no al otro. En algunos casos ha sido posible diseñar las cadenas pesadas o ligeras en las

55 interfaces de las subunidades (Carter *et al.*, 1997) con el fin de mejorar el número de moléculas que tienen sitios de unión para los dos antígenos o epítopos pero esto nunca sucede en todas las moléculas que tienen unión para los dos antígenos o epítopos.

Existen algunas pruebas de que podrían incorporarse dos especificidades de unión a anticuerpo diferentes en el mismo sitio de unión, pero estos en general representan dos o más especificidades que corresponden a antígenos o

60 epítopos o a anticuerpos relacionados estructuralmente que son de reactividad cruzada muy importante. Por

ejemplo, se han descrito anticuerpos de reactividad cruzada, normalmente en los que los dos antígenos están relacionados en secuencia y estructura, por ejemplo en la lisozima de la clara del huevo de gallina o en la lisozima del pavo (McCafferty *et al.*, documento WO-92/01047) o con hapteno y hapteno conjugado con el vehículo (Griffiths AD *et al.* EMBO J 1994 13:14 3245-60). En un ejemplo adicional, el documento WO-02/02773 (Abbott Laboratories) describe moléculas de anticuerpos con "doble especificidad". Las moléculas de anticuerpos referidas son anticuerpos preparados o seleccionados frente a múltiples antígenos, de manera que su especificidad se extiende a más de un único antígeno. Cada par V_H/V_L complementario en los anticuerpos del documento WO-02/02773 especifica una única especificidad de unión para dos o más antígenos relacionados estructuralmente; los dominios V_H y V_L en dichos pares complementarios no poseen cada uno una especificidad separada. Así los anticuerpos tienen una amplia especificidad individual que comprende dos antígenos, que están relacionados estructuralmente. Además se han descrito autoanticuerpos naturales que son polirreactivos (Casali & Notkins, Ann. Rev. Immunol. 7, 515-531), que reaccionan con al menos dos (normalmente más) antígenos o epítomos diferentes que no están relacionados estructuralmente. Se ha mostrado también que las selecciones de repertorios de péptidos aleatorios usando tecnología de presentación de fagos en un anticuerpo monoclonal identificará un intervalo de secuencias peptídicas que se ajustan al sitio de unión a antígeno. Algunas de las secuencias están altamente relacionadas, para ajustarse a una secuencia de consenso, mientras que otras son muy diferentes y se han denominado mimotopos (Pista & Stephen, Current Opinion in Immunology, 1993, 5, 268-271). Por tanto está claro que un anticuerpo natural de cuatro cadenas, que comprende dominios asociados y complementarios V_H y V_L , tiene el potencial de unirse a muchos antígenos diferentes en un gran universo de antígenos conocidos. No está tan claro cómo crear un sitio de unión con dos antígenos dados en el mismo anticuerpo, en particular en aquéllos que no están necesariamente relacionados estructuralmente.

Los métodos de diseño de proteínas han sugerido que pueden ofrecer un soporte para esto. Por ejemplo se ha propuesto también que podría crearse un anticuerpo catalítico con una actividad de unión con un ion metálico a través de un dominio variable, y con un hapteno (sustrato) a través de contactos con el ion metálico y un dominio variable complementario (Barbas *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci USA 90, 6385-6389). Sin embargo en este caso se propone que la unión y la catálisis del sustrato (primer antígeno) requiere la unión del ion metálico (segundo antígeno). Así la unión con el par V_H/V_L se refiere a un antígeno individual pero de componentes múltiples.

Se han descrito métodos para la creación de anticuerpos biespecíficos a partir de dominios individuales de cadena pesada de anticuerpos de camello en los que se crean contactos de unión para un antígeno en un dominio variable, y para un segundo antígeno en un segundo dominio variable. Sin embargo, los dominios variables no eran complementarios. Así se selecciona un primer dominio variable de cadena pesada frente a un primer antígeno, y un segundo dominio variable de cadena pesada frente a un segundo antígeno, y a continuación se unen los dos dominios entre sí en la misma cadena para proporcionar un fragmento de anticuerpo biespecífico (Conrath *et al.*, J. Biol. Chem. 270, 27589-27594). Sin embargo, los dominios individuales de cadena pesada de camello son poco frecuentes dado que proceden de anticuerpos de camello naturales que no tienen cadenas ligeras, y de hecho los dominios individuales de cadena pesada son incapaces de asociarse con cadenas ligeras de camello para formar pares V_H y V_L complementarios.

Se han descrito también dominios variables de cadena pesada individuales, obtenidos de anticuerpos naturales que normalmente están asociados con cadenas ligeras (de anticuerpos monoclonales o de repertorios de dominios; véase el documento EP-A-0368684). Se ha demostrado que estos dominios variables de cadena pesada interaccionan específicamente con uno o más antígenos relacionados, pero no se han combinado con otros dominios variables de cadena pesada o ligera para crear un ligando con una especificidad para dos o más antígenos diferentes. Además, se ha demostrado que estos dominios individuales tienen una semivida *in vivo* muy corta. Por tanto dichos dominios tienen un valor terapéutico limitado.

Se ha sugerido preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos uniendo dominios variables de cadena pesada de diferente especificidad (como se describió anteriormente). La desventaja de esta estrategia es que los dominios variables de anticuerpos aislados pueden tener una interfaz hidrófoba que normalmente interacciona con la cadena ligera y se indica al disolvente y puede ser "pegajosa" lo que permite que el dominio individual se una a las superficies hidrófobas. Además, en ausencia de una cadena ligera acompañante la combinación de dos o más dominios variables de cadena pesada diferentes y su asociación, posiblemente por medio de sus interfaces hidrófobas, pueden impedir que se unan a uno, cuando no a los dos ligandos a los que podrían unirse de forma aislada. Por otra parte, en este caso los dominios variables de cadena pesada no estarían asociados con dominios variables de cadena ligera complementarios y así pueden ser menos estables y fáciles de desplegarse (Worn & Pluckthun, 1998 Biochemistry 37, 13120-7).

55 Compendio de la invención

Los autores de la invención han descrito, en su solicitud de patente internacional en tramitación con la presente WO-03/002609 así como en la solicitud de patente de RU no publicada en tramitación con la presente 0230203.2, los ligandos de inmunoglobulinas de doble especificidad que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulinas que tienen cada uno diferentes especificidades. Los dominios pueden actuar en competencia entre sí o independientemente para unirse a antígenos o epítomos en moléculas diana. El documento WO2005/118642 describe dominios variables individuales que tienen especificidad de unión por la albúmina sérica.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un ligando que comprende un dominio variable individual de anticuerpos, en donde dicho dominio variable individual de anticuerpos comprende la secuencia de aminoácidos de dAb7h14 que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 24, Hoja 1, o una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la misma al menos en el 95 %, en donde la semivida beta T del dominio variable individual en cynomolgus es al menos el 50 % de la semivida beta T de albúmina sérica de cynomolgus en cynomolgus.

La presente invención también proporciona un ligando como se describió anteriormente, en donde el dominio variable individual de anticuerpos está unido a albúmina sérica de rata, ratón, ser humano y *Cynomolgus*.

La presente invención también proporciona un ligando como se describió anteriormente, en donde dicho dominio variable individual de anticuerpos está unido específicamente a albúmina sérica humana y a albúmina sérica no humana con valores de Kd en los límites de un factor de 10 entre sí.

La presente invención también proporciona un ligando como se describió anteriormente, que comprende además un polipéptido biológicamente activo.

La presente invención también proporciona un ligando como se describió anteriormente, en donde dicho dominio variable individual de anticuerpos está conjugado con un fármaco.

En la presente memoria se describe una mejora adicional en ligandos específicos dobles como han sido desarrollados por los autores de la presente invención, en la que una especificidad del ligando se dirige hacia una proteína o polipéptido presente *in vivo* en un organismo que puede actuar para aumentar la semivida del ligando uniéndose a él.

Por consiguiente, en la presente memoria se describe un ligando específico doble que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulinas que tiene una especificidad de unión a un primer antígeno o epítipo y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulinas complementario que tiene una actividad de unión a un segundo antígeno o epítipo, en donde uno o los dos de dichos antígenos o epítipos actúan para aumentar la semivida del ligando *in vivo* y en donde dichos dominios primero y segundo carecen de dominios mutuamente complementarios que comparten la misma especificidad, siempre que dicho ligando específico doble no consista en un dominio VH anti-HSA y un dominio V_K anti-galactosidasa. Preferiblemente, ninguno de los dominios variables primero o segundo está unido a albúmina sérica humana (HSA).

Los antígenos o epítipos que aumentan la semivida de un ligando como se describe en la presente memoria están presentes ventajosamente en proteínas o polipéptidos presentes en un organismo *in vivo*. Los ejemplos incluyen proteínas de la matriz extracelular, proteínas de la sangre y proteínas presentes en diversos tejidos en el organismo. Las proteínas actúan para reducir la velocidad de aclaramiento del ligando de la sangre, por ejemplo actuando como agentes de aumento de volumen, o anclando el ligando a un sitio de acción deseado. Los ejemplos de antígenos/epítipos que aumentan semivida *in vivo* se proporcionan en el Anexo 1 ofrecido más adelante.

El aumento de la semivida es útil en aplicaciones *in vivo* de las inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos y muy especialmente fragmentos de anticuerpos de pequeño tamaño. Dichos fragmentos (Fv, Fv con enlaces de disulfuro, Fab, scFv, dAb) experimentan un rápido aclaramiento del organismo; así, aunque son capaces de llegar a la mayoría de las partes del cuerpo rápidamente, y son rápidos de producir y fáciles de manejar, sus aplicaciones *in vivo* han estado limitadas por su breve persistencia *in vivo*. La invención resuelve este problema proporcionando una mayor semivida de los ligandos *in vivo* y por consiguiente tiempos de persistencia más prolongados en el cuerpo de la actividad funcional del ligando.

Los métodos para el análisis farmacocinético y la determinación de la semivida del ligando serán familiares para los expertos en la técnica. Pueden encontrarse detalles de los mismos en Kenneth, A *et al.*: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook to Pharmacists y en Peters *et al.*, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Se hace también referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición rev. ex (1982), que describe parámetros farmacocinéticos como las semividas t alfa y t beta y el área bajo la curva (ABC).

Las semividas (t^{1/2} alfa y t^{1/2} beta) y el ABC pueden determinarse a partir de una curva de concentración sérica de ligando con respecto al tiempo. Para modelizar la curva puede usarse, por ejemplo, el paquete de análisis WinNonlin (disponible en Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, EE.UU.). En una primera fase (la fase alfa) el ligando está experimentando principalmente distribución en el paciente, con algo de eliminación. Una segunda fase (fase beta) es la fase terminal cuando el ligando ha sido distribuido y la concentración sérica está disminuyendo a medida que el ligando se aclara en el paciente. La semivida alfa t es la semivida de la primera fase y la semivida beta t es la semivida de la segunda fase. En la presente memoria se describe un ligando o una composición que comprende un ligando que tiene una semivida t_α en el intervalo de 15 minutos o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o alternativamente, en la presente memoria se describe un ligando o composición que tiene una semivida t_β en el intervalo, inclusive, de hasta 12 horas. En una realización, el extremo superior del intervalo es 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 horas. Un ejemplo de un intervalo adecuado es de 1 a 6 horas, de 2 a 5 horas o de 3 a 4 horas.

En la presente memoria se describe un ligando o una composición que comprende un ligando que tiene una semivida t_{β} en el intervalo de 2,5 horas o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o alternativamente, un ligando o composición tiene una semivida t_{β} en el intervalo, inclusive, de hasta 21 días. En una realización, el extremo superior del intervalo es 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días o 20 días. Ventajosamente un ligando o composición tendrán una semivida t_{β} en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización adicional, estará en el intervalo de 12 a 48 horas. En una realización adicional más, estará en el intervalo de 12 a 26 horas.

Además, o alternativamente a los criterios anteriores, la descripción proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando que tiene un valor ABC (área bajo la curva) en el intervalo de 1 mg/min/ml o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mg/min/ml. Además, o alternativamente, un ligando o composición tiene una ABC en el intervalo de hasta 600 mg/min/ml. En una realización, el extremo superior del intervalo es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg/min/ml. Ventajosamente, un ligando tendrá una ABC en el intervalo seleccionado entre, pero preferiblemente no limitado a, el grupo que consiste en lo siguiente: 15 a 150 mg/min/ml, 15 a 100 mg/min/ml, 15 a 75 mg/min/ml y 15 a 50 mg/min/ml.

En una primera realización, el ligando específico doble comprende dos dominios variables complementarios, es decir, dos dominios variables que, en su entorno natural, son capaces de operar conjuntamente como un par o grupo semejante, incluso si en el contexto de la presente invención se unen de forma separada a sus epítopos semejantes. Por ejemplo, los dominios variables complementarios pueden ser dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera (V_H y V_L) de inmunoglobulinas. Los dominios V_H y V_L son proporcionados ventajosamente por fragmentos de anticuerpos scFv o Fab. Los dominios variables pueden unirse entre sí para formar ligandos multivalentes, por ejemplo: mediante la provisión de una región bisagra en el extremo C de cada dominio V y enlaces disulfuro entre cisteínas en las regiones bisagra; o la provisión de dAb cada con una cisteína en el extremo C del dominio, estando las cisteínas enlazadas entre sí por disulfuros; o la producción de V-CH y V-CL para producir un formato Fab; o el uso de grupos enlazadores peptídicos (por ejemplo, grupos enlazadores Gly₄Ser expuestos más adelante en la presente memoria) para producir dímeros, trímeros y multímeros adicionales.

Los autores de la invención han descubierto que el uso de dominios variables complementarios permite el empaquetamiento conjunto de las dos superficies de dominios y su secuestro del disolvente. Además, los dominios complementarios son capaces de estabilizarse mutuamente. Además, esto permite la creación de anticuerpos IgG específicos dobles sin las desventajas de los híbridos como se emplea en la técnica anterior, o sin la necesidad de diseñar cadenas pesadas o ligeras en las interfaces de las subunidades. Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria tienen al menos un par V_H/V_L . Una IgG biespecífica descrita en la presente memoria comprenderá por tanto dos de estos pares, un par en cada brazo de la molécula en forma de Y. Por tanto, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos o diacuerpos convencionales, en los que la proporción entre las cadenas usadas es determinante en el éxito de la preparación de los mismos y conduce a dificultades prácticas, los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria están exentos de problemas de equilibrio de la cadena. El desequilibrio de cadenas en los anticuerpos biespecíficos convencionales procede de la asociación de dos cadenas V_L diferentes con dos cadenas V_H diferentes, en los que la cadena V_L 1 junto con la cadena V_H 1 es capaz de unirse al antígeno o epítipo 1 y la cadena V_L 2 junto con la cadena V_H 2 es capaz de unirse al antígeno o epítipo 2 y los dos pares correctos están de algún modo ligados entre sí. Así, solo cuando la cadena V_L 1 está emparejada con la cadena V_H 1 y la cadena V_L 2 está emparejada con la cadena V_H 2 en una única molécula se crea la biespecificidad. Dichas moléculas biespecíficas pueden crearse de dos formas diferentes. En primer lugar, pueden crearse por asociación de dos pares V_H/V_L existentes que se unen cada uno a un antígeno o epítipo diferente (por ejemplo, en una IgG biespecífica). En este caso los pares V_H/V_L deben estar conjuntamente en una proporción 1:1 con el fin de crear una población de moléculas todas las cuales son biespecíficas. Esto nunca sucede (incluso cuando el dominio CH complementario está reforzado por un diseño de tipo "botón en ojal") lo cual conduce a una mezcla de moléculas biespecíficas y moléculas que solo pueden unirse a un antígeno o epítipo pero no al otro. La segunda forma de crear un anticuerpo biespecífico es mediante la asociación simultánea de dos cadenas V_H diferentes con dos cadenas V_L diferentes (por ejemplo en un diacuerpo biespecífico). En este caso, aunque suele existir una preferencia de las cadenas V_L 1 a emparejarse con la cadena V_H 1 y de la cadena V_L 2 a emparejarse con la cadena V_H 2 (que puede reforzarse mediante un diseño de tipo "botón en ojal" de los dominios V_L y V_H), este emparejamiento nunca se consigue en todas las moléculas, lo que conduce a una formulación mixta y con ello a la producción de emparejamientos incorrectos que son incapaces de unirse al antígeno o epítipo.

Los anticuerpos biespecíficos construidos según la estrategia del ligando específico doble descritos en la presente superan todos estos problemas debido a que la unión al antígeno o epítipo 1 reside en el dominio V_H o V_L y la unión al antígeno o epítipo 2 reside en el dominio V_L o V_H complementario, respectivamente. Dado que los dominios V_H y V_L se emparejan sobre una base 1:1 todos los emparejamientos V_H/V_L serán biespecíficos y así todos los formatos construidos usando estos emparejamientos V_H/V_L (Fv, scFv, Fab, minicuerpos, IgG, etc.) tendrán una actividad biespecífica al 100 %.

En el contexto de la presente descripción, se entiende que los "epítopos" primero y segundo son epítopos que no son el mismo y no están unidos por un ligando mono-específico individual. En la primera configuración, están ventajosamente en antígenos diferentes, uno de los cuales actúa para aumentar la semivida del ligando *in vivo*. Análogamente, los antígenos primero y segundo ventajosamente no son el mismo.

Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria no incluyen ligandos como se describe en el documento WO-02/02773. Así, los ligandos descritos en la presente memoria no comprenden pares V_H/V_L complementarios que se unen a uno cualquiera o más antígenos o epítomos cooperativamente. En su lugar, los ligandos descritos en la presente memoria comprenden un par V_H/V_L complementario, en donde los dominios V tienen diferentes especificidades.

Por otra parte, los ligandos descritos en la presente memoria comprenden pares V_H/V_L complementarios que tienen diferentes especificidades para epítomos o antígenos no relacionados estructuralmente. Los epítomos o antígenos relacionados estructuralmente son epítomos o antígenos que poseen suficiente semejanza estructural para estar unidos por un par V_H/V_L complementario convencional que actúa de forma cooperativa para unirse a un antígeno o epítomo; en el caso de epítomos relacionados estructuralmente, los epítomos son suficientemente similares en estructura para "encajar" en la misma bolsa de unión formada en el sitio de unión a antígeno del dímero $VHNL$.

En un aspecto, la descripción proporciona un ligando que comprende un primer dominio variable de inmunoglobulinas que tiene una primera especificidad de unión a antígeno o epítomo y un segundo dominio variable de inmunoglobulinas que tiene una segunda especificidad de unión a antígeno o epítomo, en donde uno o los dos de dichos dominios variables primero y segundo se unen a un antígeno que aumenta la semivida del ligando *in vivo*, y los dominios variables no son complementarios entre sí.

En una realización, la unión a un dominio variable modula la unión del ligando al segundo dominio variable.

En esta realización, los dominios variables pueden ser, por ejemplo, pares de dominios V_H o pares de dominios V_L . La unión del antígeno en el primer sitio puede modular, por ejemplo mejorar o inhibir, la unión de un antígeno en el segundo sitio. Por ejemplo, la unión en el primer sitio inhibe al menos parcialmente la unión de un antígeno en un segundo sitio. En dicha realización, el ligando puede mantenerse por ejemplo en el cuerpo de un organismo objeto *in vivo* a través de la unión a una proteína que aumenta la semivida del ligando hasta el momento en que se une al segundo antígeno diana y se disocia de la proteína que aumenta la proteína.

La modulación de la unión en el contexto anterior se consigue como una consecuencia de la proximidad estructural de los sitios de unión a antígeno relativa entre ellos. Dicha proximidad estructural puede conseguirse a partir de la naturaleza de los componentes estructurales que unen los dos o más sitios de unión a antígeno, p. ej., mediante la provisión de un ligando con una estructura relativamente rígida que mantiene los sitios de unión a antígeno en estrecha proximidad. Ventajosamente, los dos o más sitios de unión a antígeno están en estrecha proximidad físicamente entre sí de manera que un sitio modula la unión de antígeno en otro sitio mediante un proceso que implica el impedimento estérico y/o los cambios conformacionales en la molécula de inmunoglobulinas.

Los dominios de unión a antígeno primero y segundo pueden asociarse de forma covalente o no covalente. En el caso de que los dominios estén asociados covalentemente, la asociación puede estar mediada por ejemplo por enlaces de disulfuro o por un grupo enlazador polipeptídico como $(Gly_4Ser)_n$, en el que $n =$ de 1 a 8, p. ej., 2, 3, 4, 5 o 7.

Los ligandos según la invención pueden combinarse en estructuras de ligandos múltiples no de inmunoglobulinas para formar complejos multivalentes, que se unen a moléculas diana con el mismo antígeno, proporcionando así una mayor avidéz, mientras que al menos un dominio variable se une a un antígeno para aumentar la semivida del multímero. Por ejemplo, como armazones para el injerto de CDR se han usado receptores bacterianos naturales como SpA con el fin de generar ligandos que se unen específicamente a uno o más epítomos. Los detalles de este procedimiento se describen en el documento US-5.831.012. Otros armazones adecuados incluyen los basados en fibronectina y moléculas affibody™. Se describen detalles de procedimientos adecuados en el documento WO-98/58965. Otros armazones adecuados incluyen lipocalina y CTLA4, como se describe en van den Beuken *et al.*, J. Mol. Biol. (2001) 310, 591-601, y armazones como los descritos en el documento WO0069907 (Medical Research Council), que se basan por ejemplo en la estructura en anillo de GroEL bacterianos u otros polipéptidos de chaperonas.

Los armazones de proteínas pueden combinarse; por ejemplo, pueden injertarse CDR en un armazón CTLA4 y usarse junto con dominios de inmunoglobulinas V_H o V_L para formar un ligando. Análogamente, pueden combinarse fibronectina, lipocalina y otros armazones.

En el caso de que los dominios variables se seleccionan entre repertorios de genes V seleccionados por ejemplo usando tecnología de presentación de fagos como se describe en la presente memoria, entonces estos dominios variables pueden comprender una región marco universal, de manera que pueden ser reconocidos por un ligando genérico específico como se define en la presente memoria. El uso de marcos universales, los ligandos genéricos y similares se describe en el documento WO99/20749. En la presente descripción, la referencia a presentación de fagos incluye el uso de fagos y/o fagémidos.

Cuando se usan repertorios de genes V , la variación en la secuencia polipeptídica está situada preferiblemente en los lazos estructurales de los dominios variables. Las secuencias polipeptídicas de cualquier dominio variable pueden modificarse mediante barajado de ADN o por mutación con el fin de potenciar la interacción de cada dominio variable con su par complementario.

El 'ligando específico doble' puede ser un fragmentador Fv monocatenario que puede consistir en una región Fab de un anticuerpo. La expresión "región Fab" incluye una región de tipo Fab en la que se usan dos dominios VH o dos dominios VL.

Los dominios variables pueden obtenerse de anticuerpos dirigidos frente a antígenos o epítopos diana.

- 5 Alternativamente pueden obtenerse de un repertorio de dominios de anticuerpos individuales como los expresados en la superficie de bacteriófagos filamentosos. La selección puede realizarse como se describe a continuación.

En la presente memoria se describe un método para producir un ligando que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulinas que tiene una primera especificidad de unión y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulinas que tiene una segunda especificidad de unión (diferente), siendo una o las dos
10 especificidades de unión específicas de un antígeno que aumenta la semivida del ligando *in vivo*, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) selección de un primer dominio variable por su capacidad de unirse a un primer epítipo,
- (b) selección de un segundo dominio variable por su capacidad de unirse a un segundo epítipo,
- (c) combinación de los dominios variables; y

- 15 (d) selección del ligando por su capacidad de unirse a dicho primer epítipo y a dicho segundo epítipo.

El ligando puede unirse a los epítopos primero y segundo ya sea simultáneamente o, cuando existe competencia entre los dominios de unión para la unión a epítopos, la unión de un dominio puede impedir la unión de otro dominio a su epítipo semejante. En una realización, por tanto, la etapa (d) anterior requiere la unión simultánea a los epítopos primero y segundo (y posiblemente más); en otra realización, la unión a los epítopos primero y segundo no
20 es simultánea.

Los epítopos están preferiblemente en antígenos separados.

Los ligandos comprenden ventajosamente combinaciones V_H/V_L , o combinaciones V_H/V_H o V_L/V_L de dominios variables de inmunoglobulinas, como se describió anteriormente. Por otra parte, los ligandos pueden comprender dominios V_{HH} de camélidos, siempre que el dominio V_{HH} que es específico para un antígeno que aumenta la
25 semivida del ligando *in vivo* no se una a una lisozima de clara de huevo de gallina (HEL), una alfa-amilasa pancreática porcina o NmC-A; hcg, tinte azo RR6 unido a BSA o células HG982 de *S. mutans*, como se describe en Conrath *et al.*, (2001) JBC 276:7346-7350 y en el documento WO99/23221, ninguno de los cuales describe el uso de una especificidad para un antígeno que aumenta la semivida para aumentar la semivida del ligando *in vivo*.

En una realización, dicho primer dominio variable se selecciona para unirse a dicho primer epítipo en ausencia de
30 un dominio variable complementario. En una realización adicional, dicho primer dominio variable se selecciona para unirse a dicho primer epítipo/antígeno en presencia de un tercer dominio variable en el que dicho tercer dominio variable es diferente de dicho segundo dominio variable y es complementario al primer dominio. Análogamente, el segundo dominio puede seleccionarse en ausencia o presencia de un dominio variable complementario.

Los antígenos o epítopos direccionados por los ligandos descritos en la presente memoria que aumentan la
35 semivida de un ligando no se limitan a dianas de albúmina sérica. Otras realizaciones de antígenos o epítopos direccionados por los ligandos descritos en la presente memoria que aumentan la semivida de un ligando *in vivo* incluyen, pero preferiblemente no se limitan a, los antígenos y epítopos enumerados en el Anexo 1 que se ofrece más adelante.

Los antígenos o epítopos direccionados por los ligandos de la invención, además de la proteína que mejora la
40 semivida, pueden ser cualquier antígeno o epítipo, aunque ventajosamente son antígeno o epítipo direccionado con un beneficio terapéutico. La invención proporciona ligandos, que incluyen conformación abierta, conformación cerrada y ligandos de monómeros dAb aislados, específicos para cualquiera de dichas dianas, en particular las dianas identificadas especialmente en la presente memoria. Dichas dianas pueden ser, o formar parte de,
45 polipéptidos, proteínas o ácidos nucleicos, que pueden ser de ocurrencia natural o sintéticos. A este respecto, el ligando de la invención puede unirse al epítipo o antígeno y actuar como un antagonista o agonista (p. ej., agonista receptor de EPO). Un experto en la técnica observará que la elección es amplia y variada. Puede tratarse por ejemplo de proteínas, citocinas, receptores de citocinas humanos o animales, en los que los receptores de citocinas incluyen receptores para citocinas, enzimas, cofactores para enzimas o proteínas de unión a ADN. Las citocinas y los factores de crecimiento adecuados incluyen, pero preferiblemente no se limitan a: ApoE, Apo-SAA, BDNF,
50 Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, EpoR, FGF ácido, FGF básico, factor de crecimiento de fibroblastos-10, ligando FLT3, Fractalcina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α , Inhibina β , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora de Müller, factor inhibidor de colonias de monocitos,
55 proteína de atracción de monocitos, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, factor inhibidor de progenitores

mieloides-1 (MPlF-1), NAP-2, Neurturina, Factor de crecimiento nervioso, β -NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , TNF receptor I, receptor TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor VEGF 1, receptor VEGF 2, receptor VEGF 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , 5 GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3 y HER 4, CD4, receptores de quimiocinas humanos CXCR4 o CCR5, proteína no estructural tipo 3 (NS3) del virus de la hepatitis C, TNF-alfa, IgE, IFN-gamma, MMP-12, CEA, H. pylori, TB, gripe, Hepatitis E, MMP-12, receptores de internalización que están sobreexpresados en ciertas células, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor ErbB2 en células tumorales, un receptor celular de internalización receptor, receptor LDL, receptor FGF2, receptor ErbB2, receptor de transferrina, receptor PDGF, 10 receptor VEGF, PsmAr, una proteína de matriz extracelular, elastina, fibronectina, laminina, α 1-antitripsina, inhibidor de proteasa de factor tisular, PDK1, GSK1, Bad, caspasa-9, Forkhead, un antígeno de Helicobacter pylori, un antígeno de Mycobacterium tuberculosis y un antígeno de virus de la gripe. Se observará que esta lista no es en modo alguno exhaustiva.

En una realización de la invención, los dominios variables proceden de un anticuerpo respectivo dirigido frente al 15 antígeno o epítipo. En una realización preferida los dominios variables proceden de un repertorio de dominios de anticuerpos variables individuales.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican al menos un ligando específico doble como se define en la presente memoria. El ligando específico doble puede estar codificado en una única molécula de ácidos nucleicos; alternativamente, cada dominio puede estar codificado 20 por una molécula de ácidos nucleicos independiente. Cuando el ligando es codificado por una única molécula de ácidos nucleicos, los dominios pueden expresarse como un polipéptido de fusión, al modo de una molécula scFv, o pueden expresarse de forma separada y unirse posteriormente, por ejemplo usando agentes de enlace químico. Los ligandos expresados a partir de ácidos nucleicos separados estarán unidos entre sí por medios adecuados.

El ácido nucleico puede codificar además una secuencia de señal para la exportación de los polipéptidos a partir de 25 una célula hospedadora tras la expresión y puede fusionarse con un componente de superficie de una partícula bacteriófaga filamentosa (u otro componente de un sistema de presentación de selección) tras la expresión.

Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria comprenden preferiblemente combinaciones de dominios de cadena pesada y ligera. Por ejemplo, el ligando específico doble puede comprender un dominio V_H y un dominio V_L , que pueden estar unidos entre sí en forma de una scFv. Además, los ligandos pueden comprender uno 30 o más dominios C_H o C_L . Por ejemplo, los ligandos pueden comprender un dominio C_{H1} , un dominio C_{H2} o C_{H3} y/o un dominio C_L , dominios $C_{\mu 1}$, $C_{\mu 2}$, $C_{\mu 3}$ o $C_{\mu 4}$, o cualquier combinación de los mismos. Puede incluirse también un dominio de región bisagra. Dichas combinaciones de dominios puede imitar, por ejemplo, anticuerpos naturales, como IgG o IgM, o fragmentos de los mismos, como moléculas Fv, scFv, Fab o $F(ab')_2$. Se contemplan también otras estructuras, como un brazo individual de una molécula IgG que comprende dominios V_H , V_L , C_{H1} y C_L .

35 Las regiones variables pueden seleccionarse entre repertorios de genes V de dominios individuales. En general el repertorio de dominios de anticuerpos individuales se presenta en la superficie de bacteriófagos filamentosos. En una realización preferida cada dominio de anticuerpos individual se selecciona mediante la unión de un repertorio de fagos al antígeno.

Cada dominio variable individual puede seleccionarse para la unión a su antígeno o epítipo diana en ausencia de 40 una región variable complementaria. En una realización alternativa, los dominios variables individuales pueden seleccionarse para la unión a su antígeno o epítipo diana en presencia de una región variable complementaria. Así, el primer dominio variable individual puede seleccionarse en presencia de un tercer dominio variable complementario, y el segundo dominio variable puede seleccionarse en presencia de un cuarto dominio variable complementario. El tercer o cuarto dominio variable complementario puede estar en el dominio variable semejante 45 natural que tiene la misma especificidad que el dominio individual sometido a prueba, o un dominio complementario no semejante, como un dominio variable "de entrenamiento".

Preferiblemente, el ligando específico doble descrito en la presente memoria comprende solo dos dominios variables aunque es posible incorporar varios de estos ligandos juntos en la misma proteína, por ejemplo dos de estos ligandos pueden incorporarse en una IgG o una inmunoglobulina multimérica, como IgM. Alternativamente, en otra 50 realización se combina una pluralidad de ligandos específicos dobles para formar un multímero. Por ejemplo, se combinan dos ligandos específicos dobles diferentes para crear una molécula tetraespecífica.

Un experto en la técnica observará que los dominios variables ligeros y pesados de un ligando específico doble producidos según el método descrito en la presente memoria pueden estar en la misma cadena de polipéptidos, o 55 alternativamente, en cadenas de polipéptidos diferentes. En el caso en que los dominios variables están en cadenas de polipéptidos diferentes, pueden estar unidos por medio de un grupo enlazador, en general un grupo enlazador flexible (como una cadena de polipéptidos), un grupo de enlace químico o cualquier otro método conocido en la técnica.

En la presente memoria se describe una composición que comprende un ligando específico doble, que puede

obtenerse mediante un método descrito en la presente memoria, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Por otra parte, en la presente memoria se describe un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades usando un 'ligando específico doble' o una composición descrita en la presente memoria.

- 5 En una segunda configuración, la descripción proporciona ligandos multiespecíficos que comprenden al menos dos dominios variables no complementarios. Por ejemplo, los ligandos pueden comprender un par de dominios V_H o un par de dominios V_L . Ventajosamente, los dominios tienen un origen no de camélidos; preferiblemente son dominios humanos o comprenden regiones marco humanas (FW) y uno o más CDR heterólogos. Los CDR y las regiones marco son aquellas regiones de un dominio variable de inmunoglobulinas según se define en la base de datos Kabat de Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico.

10 Las regiones marco humanas preferidas son las codificadas por segmentos génicos de línea germinal DP47 y DPK9. Ventajosamente, FW1, FW2 y FW3 de un dominio V_H o V_L tienen la secuencia de FW1, FW2 o FW3 de DP47 o DPK9. Los marcos humanos pueden contener opcionalmente mutaciones, por ejemplo hasta aproximadamente 5 cambios de aminoácidos o hasta aproximadamente 10 cambios de aminoácidos colectivamente en los marcos humanos usados en los ligandos de la invención.

15 Los dominios variables en los ligandos multiespecíficos según la descripción en la presente memoria pueden estar organizados en una conformación abierta o cerrada; es decir, pueden estar dispuestos de manera que los dominios variables pueden unirse a sus ligandos semejantes de forma independiente y simultánea, o de manera que solo uno de los dominios variables puede unirse a su ligando semejante en cualquier momento dado.

- 20 Los autores de la invención han comprendido que en ciertas condiciones estructurales, los dominios variables no complementarios (por ejemplo dos dominios variables de cadena ligera o dos dominios variables de cadena pesada) pueden estar presentes en un ligando de manera que la unión de un primer epítipo a un primer dominio variable inhibe la unión de un segundo epítipo a un segundo dominio variable, aun cuando dichos dominios no complementarios no actúen conjuntamente como un par semejante. Ventajosamente, el ligando comprende dos o más pares de dominios variables; es decir, comprende al menos cuatro dominios variables. Ventajosamente, los cuatro dominios variables comprenden marcos de origen humano.

En una realización preferida, los marcos humanos son idénticos a los de las secuencias de línea germinal humana.

Los autores de la presente invención consideran que dichos anticuerpos tendrán un uso en particular en los ensayos de unión a ligandos para usos terapéuticos y de otros tipos.

- 30 Así, la descripción proporciona un método para producir un ligando multiespecífico que comprende las etapas de:
- a) selección de un primer dominio de unión a epítipos por su capacidad de unirse a un primer epítipo,
 - b) selección de un segundo dominio de unión a epítipos por su capacidad de unirse a un segundo epítipo,
 - c) combinación de los dominios de unión a epítipos; y
 - d) selección del ligando multiespecífico de conformación cerrada por su capacidad de unirse a dicho primer segundo epítipo y dicho segundo epítipo.

40 En un aspecto adicional de la segunda configuración, la descripción proporciona un método para preparar un ligando multiespecífico de conformación cerrada que comprende un primer dominio de unión a epítipos que tiene una primera especificidad de unión a epítipos y un segundo dominio de unión a epítipos complementario que tiene una segunda especificidad de unión a epítipos, en donde las especificidades de unión primera y segunda compiten por la unión a epítipos de manera que el ligando multiespecífico de conformación cerrada no puede unirse a los dos epítipos simultáneamente, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) selección de un primer dominio de unión a epítipos por su capacidad de unirse a un primer epítipo,
- b) selección de un segundo dominio de unión a epítipos por su capacidad de unirse a un segundo epítipo,
- c) combinación de los dominios de unión a epítipos de manera que los dominios están en una conformación cerrada; y
- d) selección del ligando multiespecífico de conformación cerrada por su capacidad de unirse a dicho primer segundo epítipo y dicho segundo epítipo, pero no a dichos epítipos primero y segundo simultáneamente.

50 Por otra parte, la descripción proporciona un ligando multiespecífico de conformación cerrada que comprende un primer dominio de unión a epítipos que tiene una primera especificidad de unión a epítipos y un segundo dominio de unión a epítipos no complementario que tiene una segunda especificidad de unión a epítipos, en donde las especificidades de unión primera y segunda compiten por la unión a epítipos de manera que el ligando

multiespecífico de conformación cerrada no puede unirse a los dos epítomos simultáneamente.

Una realización alternativa del aspecto anterior de la segunda configuración de la descripción comprende opcionalmente una etapa adicional (b1) que comprende la selección de un tercero o más dominio de unión a epítomos. De esta forma el ligando multiespecífico producido, ya tenga conformación abierta o cerrada, comprende más de dos especificidades de unión a epítomos. En un aspecto preferido de la segunda configuración de la descripción, en el que el ligando multiespecífico comprende más de dos dominios de unión a epítomos, al menos dos de dichos dominios están en una conformación cerrada y compiten por la unión; otros dominios pueden competir por la unión o pueden tener libertad para asociarse independientemente con su epítomo o epítomos semejantes.

La expresión 'ligando multiespecífico' se refiere a un ligando que posee más de una especificidad de unión a epítomos como se define en la presente memoria.

Como se define en la presente memoria la expresión 'conformación cerrada' (ligando multiespecífico) significa que los dominios de unión a epítomos del ligando están unidos o asociados entre sí, opcionalmente por medio de un esqueleto de proteínas, de manera que la unión a epítomos por un dominio de unión a epítomos compite con la unión a epítomos por otro dominio de unión a epítomos. Es decir, los epítomos semejantes pueden estar unidos por cada dominio de unión a epítomos individualmente, pero no simultáneamente. La conformación cerrada del ligando puede conseguirse usando los métodos descritos en la presente memoria.

"Conformación abierta" significa que los dominios de unión a epítomos del ligando están unidos o asociados entre sí, opcionalmente por medio de un esqueleto de proteínas, de manera que la unión a epítomos por un dominio de unión a epítomos no compite con la unión a epítomos por otro dominio de unión a epítomos.

Como se refiere en la presente memoria, el término 'compite' significa que la unión de un primer epítomo a su dominio de unión a epítomos semejante está inhibida cuando un segundo epítomo se une a su dominio de unión a epítomos semejante. Por ejemplo, la unión puede inhibirse estéricamente, por ejemplo por bloqueo físico de un dominio de unión o por alteración de la estructura o entorno de un dominio de unión de manera que su afinidad o avidéz para un epítomo se reduce.

En una realización adicional de la segunda configuración, los epítomos pueden desplazarse mutuamente en la unión. Por ejemplo, un primer epítomo puede estar presente en un antígeno que, al unirse a su primer dominio de unión semejante, provoca un impedimento estérico de un segundo dominio de unión, o un cambio conformacional en el mismo, que desplaza el epítomo unido al segundo dominio de unión.

Ventajosamente, la unión se reduce en el 25 % o más, ventajosamente el 40 %, 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, 90 % o más, y preferiblemente hasta el 100 % o aproximadamente, de manera que la unión se inhibe completamente. La unión de epítomos puede medirse por ensayos de unión a antígenos convencionales, como ELISA, por técnicas basadas en fluorescencia, incluida FRET, o por técnicas como resonancia por plasmones superficiales que miden la masa de las moléculas. La unión específica de una proteína de unión a antígeno con un antígeno o epítomo puede determinarse mediante un ensayo adecuado, que incluye, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos como ELISA y ensayos de competencia de tipo intercalación, y las diferentes variantes de los mismos.

La afinidad de unión se determina preferiblemente usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia). El sistema Biacore emplea la resonancia por plasmones superficiales (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton y Myszk, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) para vigilar las interacciones biomoleculares en tiempo real, y emplea la resonancia por plasmones superficiales que puede detectar cambios en el ángulo de resonancia de la luz en la superficie de una fina película de oro sobre un soporte de vidrio como consecuencia de los cambios en el índice de refracción de la superficie hasta una separación de 300 nm. El análisis Biacore genera convenientemente constantes de velocidad de asociación, constantes de velocidad de disociación, constantes de disociación en equilibrio y constantes de afinidad. La afinidad de unión se obtiene valorando las constantes de tasas de asociación y disociación mediante el uso de un sistema Biacore de resonancia por plasmones superficiales (Biacore, Inc.). Se activa un chip de biosensores para acoplamiento covalente de la diana según las instrucciones del fabricante (Biacore). A continuación se diluye la diana y se inyecta en el chip para obtener una señal en unidades de respuesta de material inmovilizado. Dado que la señal en unidades de resonancia (RU) es proporcional a la masa de material inmovilizado, esto representa un intervalo de densidades diana inmovilizadas en la matriz. Los datos de disociación se ajustan a un modelo de un solo sitio para obtener k_{off} +/- d.t. (desviación típica de medidas). Se calcula una constante de velocidad de pseudoprimer orden (Kd) para cada curva de asociación, y se representa gráficamente en función de la concentración de proteínas para obtener k_{on} +/- e.s. (error estándar de ajuste). Las constantes de disociación de equilibrio para la unión, Kd, se calculan a partir de medidas de SPR como k_{off}/k_{on} .

Como describen Phizicky y Field en Microb. Rev. (1995) 59:114-115, se inmoviliza un antígeno adecuado, como HSA, en un polímero de dextrano, y una solución que contiene un ligando para HSA, como un dominio variable individual, fluye a través de una célula, en contacto con el HSA inmovilizado. El dominio variable individual retenido por el SHA inmovilizado altera el ángulo de resonancia de la luz incidente, lo que provoca un cambio en el índice de

refracción provocado por el aumento en las cantidades de proteínas, es decir, el dominio variable individual, cerca del polímero de dextrano. Dado que todas las proteínas tienen el mismo índice de refracción y como existe una correlación lineal entre el desplazamiento del ángulo de resonancia y la concentración de proteínas cerca de la superficie, pueden medirse los cambios en la concentración de proteínas en la superficie debidos a la unión
 5 proteína/proteína, véase Phizicky y Field, más arriba. Para determinar una constante de unión, se mide el aumento en unidades de resonancia (RU) en función del tiempo haciendo pasar una solución de proteínas de dominio variable individual por el ligando inmovilizado (HSA) hasta que los valores de RU se estabilizan, y después se mide la disminución en RU en función del tiempo con tampón que carece del dominio variable individual. Este procedimiento se repite para varias concentraciones diferentes de proteínas de dominio variable individual. Se
 10 describen los antecedentes teóricos y los procedimientos detallados en R. Karlsson, et. al. (1991) J. Immunol. Methods, 145, 229.

El software del instrumento produce una constante de disociación de equilibrio (K_d) como se describió anteriormente. Se describe una constante de disociación de equilibrio determinada a través del uso de resonancia por plasmones superficiales en la patente de EE.UU. 5.573.957, basándose en una tabla de valores de dRA/dt y RA,
 15 en la que R en este ejemplo es el complejo de HSA/dominio variable individual medido por Biacore en unidades de resonancia y en el que dR/dt es la velocidad de formación de complejos de HSA/dominio variable individual, es decir, la derivada de la curva de unión; representando la gráfica dRA/dt con respecto a RA para varias concentraciones diferentes de dominio variable individual, y posteriormente representando las pendientes de estas líneas con respecto a la concentración de dominio variable individual, la pendiente de esta segunda gráfica es la constante de
 20 velocidad de asociación (M^{-1}, s^{-1}). La constante de velocidad de disociación o la velocidad a la que el HSA y el dominio variable individual se liberan mutuamente, puede determinarse usando la curva de disociación generada en Biacore. Representando gráficamente y determinando la pendiente del log del descenso en la respuesta con respecto a la curva del tiempo, puede medirse la constante de velocidad de disociación. Constante de disociación de equilibrio $K_d =$ Constante de velocidad de disociación/Constante de velocidad de asociación.

25 Según el método descrito en la presente memoria, ventajosamente, cada dominio de unión a epítomos variable individual tiene una especificidad de unión a epítomos diferente.

En el contexto de la presente descripción, se entiende que los "epítomos" primero y segundo son epítomos que no son el mismo y que no están unidos por un único ligando monoespecífico. Pueden estar en antígenos diferentes o en el mismo antígeno, pero separados por una distancia suficiente de manera que no forman una única entidad que
 30 podría estar unida por un par de unión V_H/V_L monoespecífico de un anticuerpo convencional. Experimentalmente, si los dos dominios variables individuales en una única forma de anticuerpo de cadena (anticuerpos de dominio o dAb) compiten por separado por un ligando V_H/V_L monoespecífico frente a dos epítomos entonces estos dos epítomos no están suficientemente separados para ser considerados epítomos independientes.

Los ligandos multiespecíficos de conformación cerrada descritos en la presente memoria no incluyen ligandos como se describe en el documento WO-02/02773. Así, los ligandos descritos en la presente memoria no comprenden pares V_H/V_L complementarios que se unen a uno cualquiera o más antígenos o epítomos cooperativamente. En su lugar, los ligandos descritos en la presente memoria preferiblemente comprenden pares V_H-V_H o V_L-V_L no complementarios. Ventajosamente, cada dominio V_H o V_L en cada par V_H-V_H o V_L-V_L tiene una especificidad
 35 diferente de unión a epítomos, y los sitios de unión a epítomos están dispuestos de manera que la unión de un epítomo en un sitio compite con la unión de un epítomo en otro sitio.

Ventajosamente, cada dominio de unión a epítomos comprende un dominio variable de inmunoglobulinas. Más ventajosamente, cada dominio de unión a epítomos será un dominio variable de cadena ligera (V_L) o un dominio variable de cadena pesada (V_H) de un anticuerpo. En la segunda configuración de la presente descripción, los dominios de inmunoglobulinas cuando están presentes en un ligando según la presente invención son no
 45 complementarios, es decir, no se asocian para formar un sitio de unión a antígeno V_H/V_L . Así, los ligandos multiespecíficos como se define en la presente memoria comprenden dominios de inmunoglobulinas del mismo subtipo, es decir, dominios variables de cadena ligera (V_L) o dominios variables de cadena pesada (V_H). Por otra parte, cuando el ligando según la invención está en conformación cerrada, los dominios de inmunoglobulinas pueden ser del tipo V_{HH} de camélido.

50 En una realización alternativa, el o los ligandos según la invención no comprenden un dominio V_{HH} de camélido. Más en concreto, el o los ligandos de la invención no comprenden uno o más residuos de aminoácidos que son específicos de dominios V_{HH} de camélido en comparación con dominios V_H humanos.

Ventajosamente, los dominios variables individuales se obtienen de anticuerpos seleccionados para actividad de unión frente a antígenos o epítomos diferentes. Por ejemplo, los dominios variables pueden aislarse al menos en
 55 parte por inmunización humana. En la técnica se conocen métodos alternativos, que incluyen aislamiento a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos y síntesis de genes de anticuerpos artificiales.

En realizaciones seleccionadas un dominio variable individual es un dominio variable individual de ocurrencia natural. En otras realizaciones seleccionadas el dominio variable individual es de ocurrencia no natural. La expresión "de ocurrencia natural" se emplea en la presente memoria para indicar que un objeto, p. ej., un dominio de proteínas,

p. ej., un dominio variable individual, o un dominio variable individual de anticuerpos, puede encontrarse en la naturaleza. Así, un dominio de proteínas de ocurrencia natural, como una región V de un anticuerpo, existe en una proteína, p. ej. en una proteína de cadena de anticuerpo, expresada en la naturaleza, por ejemplo, en una especie no recombinante, p. ej., mamíferos, primates, roedores, peces, aves, reptiles, etc. Para descartar dudas, un dominio variable individual aislado de un repertorio de polipéptidos expresados a partir de ácidos nucleicos en los que se introdujo diversidad *in vitro* es un dominio variable individual de ocurrencia no natural. Para descartar aún más dudas, un dominio variable individual de anticuerpos que procede de un anticuerpo resultante de inmunización de un animal es un dominio variable individual de ocurrencia natural.

Los dominios variables se unen ventajosamente a superantígenos, como proteína A o proteína L. La unión a superantígenos es una propiedad de los dominios de anticuerpos variables con plegamiento correcto, y permite aislar dichos dominios, por ejemplo, de bibliotecas de dominios recombinantes o mutantes.

Los dominios de unión a epítomos según la presente invención comprenden un almacén de proteínas y sitios de interacción de epítomos (que están ventajosamente en la superficie del almacén de proteínas).

Los dominios de unión a epítomos pueden basarse también en armazones o esqueletos de proteínas distintos de los dominios de inmunoglobulinas. Por ejemplo, los receptores de bacterias naturales como SpA se han usado como armazones para el injerto de CDR con el fin de generar ligandos que se unen específicamente a uno o más epítomos. Los detalles de este procedimiento se describen en el documento US-5.831.012. Otros armazones adecuados incluyen los basados en fibronectina y moléculas affibody. Los detalles de los procedimientos adecuados se describen en el documento WO-98/58965. Otros armazones adecuados incluyen lipocalina y CTLA4, como se describe en van den Beuken *et al.*, J. Mol. Biol. (2001) 310, 591-601, y armazones como los descritos en el documento WO0069907 (Medical Research Council), que se basan por ejemplo en la estructura de anillo de GroEL bacteriano u otros polipéptidos de chaperonas.

Los armazones de proteínas pueden combinarse; por ejemplo, las CDR pueden injertarse en un almacén CTLA4 almacén y usarse junto con dominios de inmunoglobulinas V_H o V_L para formar un ligando multivalente. Análogamente, la fibronectina, la lipocalina y otros armazones pueden combinarse.

Un experto en la técnica observará que los dominios de unión a epítomos de un ligando multiespecífico de conformación cerrada producido según el método descrito en la presente memoria pueden estar en la misma cadena de polipéptidos, o alternativamente, en cadenas de polipéptidos diferentes. En el caso de que los dominios variables estén en cadenas de polipéptidos diferentes, pueden enlazarse por medio de un grupo enlazador, ventajosamente un grupo enlazador flexible (como una cadena de polipéptidos), un grupo de enlace químico o cualquier otro método conocido en la técnica.

Los dominios de unión a epítomos primero y segundo pueden asociarse por medios covalentes o no covalentes. En el caso de que los dominios se asocien covalentemente, la asociación puede estar mediada por ejemplo por enlaces de disulfuro.

En la segunda configuración, los epítomos primero y segundo son preferiblemente diferentes. Pueden ser, o formar parte de, polipéptidos, proteínas o ácidos nucleicos, que pueden ser de ocurrencia natural o sintéticos. A este respecto, el ligando puede unirse a un epítomo o antígeno y actuar como un antagonista o agonista (p. ej., agonista de receptor de EPO). Los dominios de unión a epítomos del ligando en una realización tienen la misma especificidad de epítomos, y por ejemplo pueden unirse simultáneamente a su epítomo cuando en el mismo antígeno están presentes múltiples copias del epítomo. En otra realización, estos epítomos se proporcionan en antígenos diferentes de manera que el ligando puede unirse a los epítomos y puentear los antígenos. Un experto en la técnica observará que la cantidad de epítomos y antígenos es tan grande y variada como cualquier diana descrita en el Anexo 2 o el Anexo 3, ya sea en combinación como se indica en los Anexos, en una combinación diferente o individualmente. Los receptores de citocinas incluyen receptores para las citocinas anteriores, p. ej. IL-1 R1; IL-6R; IL-10R; IL-18R, así como receptores para las citocinas expuestas en el Anexo 2 o el Anexo 3 y también receptores descritos en los Anexos 2 y 3. Se observará que esta lista no es en modo alguno exhaustiva. Cuando el ligando multiespecífico está unido a dos epítomos (en el mismo antígeno o en antígenos diferentes), el o los antígenos pueden seleccionarse entre esta lista.

Ventajosamente, los ligandos específicos dobles pueden usarse para dirigirse a citocinas y otras moléculas que cooperan sinérgicamente en situaciones terapéuticas en el cuerpo de un organismo. La descripción en la presente memoria proporciona por tanto un método para sinergizar la actividad de dos o más citocinas, que comprende la administración de un ligando específico doble capaz de unirse a dichas dos o más citocinas. En este aspecto de la descripción, el ligando específico doble puede ser cualquier ligando específico doble, lo que incluye un ligando compuesto por dominios complementarios y/o no complementarios, un ligando en una conformación abierta, y un ligando en una conformación cerrada. Por ejemplo, este aspecto de la invención se refiere a combinaciones de dominios V_H y V_L , dominios solo V_H y dominios solo V_L .

La sinergia en un contexto terapéutico puede conseguirse de diversas maneras. Por ejemplo, las combinaciones diana pueden ser terapéuticamente activas solo si el ligando se direcciona a las dos dianas, mientras que el

direccionamiento únicamente en una diana no es terapéuticamente eficaz. En otra realización, una diana en solitario puede proporcionar un efecto terapéutico bajo o mínimo, pero junto con una segunda diana la combinación proporciona un aumento sinérgico en el efecto terapéutico.

Preferiblemente, las citocinas unidas por los ligandos específicos dobles de este aspecto de la descripción se seleccionan entre la lista mostrada en el Anexo 2.

Por otra parte, los ligandos específicos dobles pueden usarse en aplicaciones de oncología, en las que una especificidad se dirige a CD89, que se expresa mediante células citotóxicas, y la otra es específica del tumor. En el Anexo 3 se proporcionan ejemplos de antígenos tumorales que pueden ser direccionados.

10 En una realización de la segunda configuración, los dominios variables se obtienen de un anticuerpo dirigido frente al primer y/o el segundo antígeno o epítipo. En una realización preferida los dominios variables se obtienen de un repertorio de dominios de anticuerpos variables individuales. En un ejemplo, el repertorio es un repertorio que no se crea en un repertorio animal o sintético. En otro ejemplo, los dominios variables individuales no han sido aislados (al menos en parte) por inmunización animal. Así, los dominios individuales pueden aislarse a partir de una biblioteca nueva.

15 La segunda configuración, en otro aspecto, proporciona un ligando multiespecífico que comprende un primer dominio de unión a epítopos que tiene una primera especificidad de unión a epítopos y un segundo dominio de unión a epítopos no complementario que tiene una segunda especificidad de unión a epítopos. Las especificidades de unión primera y segunda pueden ser las mismas o diferentes.

20 En un aspecto adicional, la descripción proporciona un ligando multiespecífico de conformación cerrada que comprende un primer dominio de unión a epítopos que tiene una primera especificidad de unión a epítopos y un segundo dominio de unión a epítopos no complementario que tiene una segunda especificidad de unión a epítopos en donde las especificidades de unión primera y segunda son capaces de competir por la unión a epítopos de manera que el ligando multiespecífico de conformación cerrada no puede unirse a los dos epítopos simultáneamente.

25 En un aspecto adicional más, la descripción proporciona ligandos de conformación abierta que comprenden dominios de unión no complementarios, en donde los dominios son específicos para un epítipo diferente en la misma diana. Dichos ligandos se unen a dianas con mayor avidéz. Análogamente, la descripción proporciona ligandos multivalentes que comprenden dominios de unión no complementarios específicos para el mismo epítipo y dirigidos a dianas que comprenden múltiples copias de dicho epítipo, como IL-5, PDGF-AA, PDGF-BB, TGF- β ,
30 TGF- β 2, TGF- β 3 y TNF α , por ejemplo, así como receptor TNF 1 humano y TNF α humano.

En un aspecto similar, los ligandos según la invención pueden configurarse para unirse a epítopos individuales con baja afinidad, de manera que la unión a epítopos individuales no es terapéuticamente importante; sin embargo, el aumento de la avidéz derivado de la unión a dos epítopos proporciona un beneficio terapéutico. En un ejemplo en particular, pueden direccionarse epítopos que están presentes individualmente en tipos celulares normales, pero
35 están presentes juntos solo en células anómalas o enfermas, como las células tumorales. En esta situación, solo las células anómalas o enfermas son objeto de direccionamiento de manera eficaz mediante los ligandos biespecíficos descritos en la presente memoria. Los ligandos específicos para múltiples copias del mismo epítipo, o epítopos adyacentes, en la misma diana (conocidos como dAb de quelación) también pueden ser ligandos triméricos o poliméricos (tetraméricos o más) que comprenden tres, cuatro o más dominios de unión no complementarios. Por
40 ejemplo, los ligandos pueden construirse de manera que comprendan tres o cuatro dominios VH o dominios VL.

Por otra parte, se proporcionan ligandos que se unen a dianas multisubunidad, en donde cada dominio de unión es específico para una subunidad de dicha diana. El ligando puede ser dimérico, trimérico o polimérico.

Preferiblemente, los ligandos multiespecíficos según los aspectos anteriores de la descripción pueden obtenerse por el método descrito en la presente memoria.

45 Según el aspecto anterior de la segunda configuración, ventajosamente el primer dominio de unión a epítopos y los segundos dominios de unión a epítopos son dominios variables de inmunoglobulinas no complementarios, como se define en la presente memoria. Es decir, son dominios variables vH-vH o vL-vL.

Los dAb de quelación en particular pueden prepararse según un aspecto preferido de la descripción, en concreto el uso de dAb de anclaje, en los que se construye una biblioteca de dAb diméricos, triméricos o multiméricos usando
50 un vector que comprende un dAb constante en dirección 5' o dirección 3' de una secuencia de grupo enlazador, con un repertorio de segundos, terceros y más dAb insertados en el otro lado del grupo enlazador. Por ejemplo, el dAb de anclaje o guiado puede ser TAR1-5 (VK), TAR1-27(VK), TAR2h-5(VH) o TAR2h-6(VK).

En metodologías alternativas, el uso de grupos enlazadores puede evitarse, por ejemplo mediante el uso de unión no covalente o afinidad natural entre dominios de unión como VH y VK. En la presente memoria se describe un
55 método para preparar un ligando multimérico de quelación que comprende las etapas de:

(a) suministro de un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de unión individual específico para un primer epítipo en una diana;

(b) suministro de un vector que codifica un repertorio que comprende segundos dominios de unión específicos para un segundo epítipo en dicha diana, de manera que ese epítipo puede ser el mismo que el primer epítipo o diferente, siendo dicho segundo epítipo adyacente a dicho primer epítipo; y

(c) expresión de dichos dominios de unión primero y segundo; y

(d) aislamiento de dichas combinaciones de dominios de unión primero y segundo que se combinan juntos para producir un dímero de unión a la diana.

Los epítopos primero y segundo son adyacentes de manera que un ligando multimérico es capaz de unirse a los dos epítopos simultáneamente. Este hecho proporciona al ligando las ventajas de mayor avidéz si se une. Cuando los epítopos son el mismo, el aumento de la avidéz se obtiene por la presencia de múltiples copias del epítipo en la diana, lo que permite que se unan al menos dos copias simultáneamente con el fin de obtener el aumento en el efecto de avidéz.

Los dominios de unión pueden asociarse mediante varios métodos, así como por el uso de grupos enlazadores. Por ejemplo, los dominios de unión pueden comprender residuos cis, grupos de avidina y estreptavidina u otros medios para la fijación no covalente después de la síntesis; estas combinaciones que se unen a la diana eficientemente serán aisladas. Alternativamente, puede estar presente un grupo enlazador entre los dominios de unión primero y segundo, que se expresan como un único polipéptido a partir de un único vector, que comprende el primer dominio de unión, el grupo enlazador y un repertorio de segundos dominios de unión, por ejemplo como se describió anteriormente.

En un aspecto preferido, los dominios de unión primero y segundo se asocian naturalmente cuando se unen a un antígeno; por ejemplo, los dominios VH y VL (p. ej. VI), cuando se unen a epítopos adyacentes, se asociarán naturalmente en una interacción de tres vías para formar un dímero estable. Dichas proteínas asociadas pueden aislarse en un ensayo de unión a diana. Una ventaja de este procedimiento es que solo los dominios de unión que se unen a epítopos cercanamente adyacentes, en la conformación correcta, se asociarán y así serán aislados como consecuencia de su mayor avidéz por la diana.

En una realización alternativa del aspecto anterior de la segunda configuración de la descripción, al menos un dominio de unión a epítopos comprende un 'armazón de proteínas' o 'esqueleto de proteínas' no de inmunoglobulinas como se define en la presente memoria. Los armazones de proteínas no inmunoglobulinas incluyen pero preferiblemente no se limitan a cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en: SpA, fibronectina, GroEL y otras chaperonas, lipocalina, CCTLA4 y moléculas affibody, como se indica anteriormente.

Según el aspecto anterior de la segunda configuración de la descripción, ventajosamente, los dominios de unión a epítopos se fijan a un 'esqueleto de proteínas'. Ventajosamente, un esqueleto de proteínas es un esqueleto de inmunoglobulinas.

Según la presente descripción, la expresión 'esqueleto de inmunoglobulinas' se refiere a una proteína que comprende al menos un plegamiento de inmunoglobulinas y que actúa como un núcleo para uno o más dominios de unión a epítopos, como se define en la presente memoria.

Los esqueletos de inmunoglobulinas preferidos como se define en la presente memoria incluyen uno cualquiera o más de los seleccionados entre los siguientes: una molécula de inmunoglobulinas que comprende al menos (i) el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo; o (ii) el dominio CH1 de una cadena pesada de anticuerpos; una molécula de inmunoglobulinas que comprende los dominios CH1 y CH2 de una cadena pesada de anticuerpos; una molécula de inmunoglobulinas que comprende los dominios CH1, CH2 y CH3 de una cadena pesada de anticuerpos; o cualquiera del subconjunto (ii) en conjunción con el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo. También puede incluirse un dominio de región bisagra. Dichas combinaciones de dominios pueden, por ejemplo, emular anticuerpos naturales, como IgG o IgM, o fragmentos de los mismos, como moléculas Fv, scFv, Fab o F(ab')₂. Los expertos en la técnica apreciarán que esta lista no pretende ser exhaustiva.

El enlace del esqueleto con los dominios de unión a epítopos, como se define en la presente memoria, puede conseguirse en el nivel de polipéptidos, es decir, después de la expresión del ácido nucleico que codifica el esqueleto y/o los dominios de unión a epítopos. Alternativamente, la etapa de enlace puede realizarse en el nivel del ácido nucleico. Los métodos para enlazar un esqueleto de proteínas con el uno o más dominios de unión a epítopos incluyen el uso de técnicas de química de proteínas y/o biología molecular que serán conocidos para los expertos en la técnica y que se describen en la presente memoria.

Ventajosamente, el ligando multiespecífico de conformación cerrada puede comprender un primer dominio capaz de unirse a una molécula diana, y un segundo dominio capaz de unirse a una molécula o grupo que prolonga la semivida del ligando. Por ejemplo, la molécula o grupo puede ser un agente de formación de volumen, como HSA o una proteína de matriz celular. Como se emplea en la presente memoria, la frase "molécula o grupo que prolonga la

semivida de un ligando" se refiere a una molécula o grupo químico que, cuando se une mediante un ligando específico doble como se describe en la presente memoria aumenta la semivida in vivo de dicho ligando específico doble cuando se administra a un animal, con respecto a un ligando que no se une a esa molécula o grupo. Los ejemplos de moléculas o grupos que prolongan la semivida de un ligando se describen a continuación en la presente memoria. En una realización preferida, el ligando multiespecífico de conformación cerrada puede ser capaz de unirse a la molécula diana solo en el desplazamiento de la molécula o grupo que potencian la semivida. Así, por ejemplo, un ligando multiespecífico de conformación cerrada se mantiene en circulación en el torrente sanguíneo de un sujeto mediante una molécula de formación de volumen como HSA. Cuando se encuentra una molécula diana, la competencia entre los dominios de unión del ligando multiespecífico de conformación cerrada provocan el desplazamiento del HSA y la unión de la diana.

Un ligando según cualquier aspecto de la presente descripción incluye un ligando que tiene o consiste en al menos un dominio variable individual, en forma de un dominio variable individual de monómeros o en forma de múltiples dominios variables individuales, es decir, un multímero. El ligando puede modificarse para contener restos adicionales, como una proteína de fusión, o un conjugado. Dicho ligando multimérico, p. ej., en forma de un ligando específico doble, y/o dicho ligando que comprende o consiste en un dominio variable individual, es decir, un monómero de dAb útil para construir dicho ligando multimérico, puede disociarse ventajosamente de su o sus dianas semejantes con una K_d de 300 nM o menos, de 300 nM a 5 pM (es decir, de 3×10^{-7} a 5×10^{-12} M), preferiblemente de 50 nM a 20 pM, o de 5 nM a 200 pM o de 1 nM a 100 pM, 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos, 1×10^{-9} M o menos, 1×10^{-10} M o menos, 1×10^{-11} M o menos; y/o una constante de velocidad K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ S}^{-1}$, preferiblemente de 1×10^{-2} a $1 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$ o de 5×10^{-3} a $1 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ o de $5 \times 10^{-1} \text{ S}^{-1}$ o menos o de $1 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$ o menos o de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ o menos o de $1 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ o menos o de $1 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ o menos o de $1 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$ o menos como se determina, por ejemplo, por resonancia por plasmones superficiales. La constante de velocidad K_d se define como K_{off}/K_{on} . En general se considera que un valor K_d mayor que 1 Molar indica unión no específica. Preferiblemente, un dominio variable individual se unirá específicamente a un antígeno o epítipo diana con una afinidad de menos de 500 nM, preferiblemente menos de 200 nM, y más preferiblemente menos de 10 nM, por ejemplo menos de 500 pM

La descripción en la presente memoria proporciona un ligando de monómero dAb anti-TNF α (o ligando específico doble que comprende dicho dAb), homodímero, heterodímero o homotrímero, en donde cada dAb se une a TNF α . El ligando está unido a TNF α con una K_d de 300 nM a 5 pM (es decir, de 3×10^{-7} a 5×10^{-12} M), preferiblemente de 50 nM a 20 pM, más preferiblemente de 5 nM a 200 pM y lo más preferiblemente de 1 nM a 100 pM; expresado de una forma alternativa, la K_d es 1×10^{-7} M o menos, preferiblemente 1×10^{-8} M o menos, más preferiblemente 1×10^{-9} M o menos, ventajosamente 1×10^{-10} M o menos y lo más preferiblemente 1×10^{-11} M o menos; y/o una constante de velocidad K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ S}^{-1}$, preferiblemente de 1×10^{-2} a $1 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$, más preferiblemente de 5×10^{-3} a $1 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$, por ejemplo de $5 \times 10^{-1} \text{ S}^{-1}$ o menos, preferiblemente de $1 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$ o menos, más preferiblemente de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ o menos, ventajosamente de $1 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ o menos, más ventajosamente de $1 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ o menos, y lo más preferiblemente de $1 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$ o menos, según se determina por resonancia por plasmones superficiales.

Preferiblemente, el ligando neutraliza TNF α en un ensayo L929 estándar con DN50 de 500 nM a 50 pM, preferiblemente o de 100 nM a 50 pM, ventajosamente de 10 nM a 100 pM, más preferiblemente de 1 nM a 100 pM; por ejemplo de 50 nM o menos, preferiblemente de 5 nM o menos, ventajosamente de 500 pM o menos, más preferiblemente de 200 pM o menos y lo más preferiblemente de 100 pM o menos.

Preferiblemente, el ligando inhibe la unión de TNF alfa a receptor TNF alfa I (receptor p55) con CI50 de 500 nM a 50 pM, preferiblemente de 100 nM a 50 pM, más preferiblemente de 10 nM a 100 pM, ventajosamente de 1 nM a 100 pM; por ejemplo de 50 nM o menos, preferiblemente de 5 nM o menos, más preferiblemente de 500 pM o menos, ventajosamente de 200 pM o menos, y lo más preferiblemente de 100 pM o menos. Preferiblemente, el TNF α es TNF α humano.

Además, la descripción en la presente memoria proporciona un monómero dAb de receptor anti-TNF I, o ligando específico doble que comprende dicho dAb, que está unido a receptor de TNF I con una K_d de 300 nM a 5 pM (es decir, de 3×10^{-7} a 5×10^{-12} M), preferiblemente de 50 nM a 20 pM, más preferiblemente de 5 nM a 200 pM y lo más preferiblemente de 1 nM a 100 pM, por ejemplo de 1×10^{-7} M o menos, preferiblemente de 1×10^{-8} M o menos, más preferiblemente de 1×10^{-9} M o menos, ventajosamente de 1×10^{-10} M o menos y lo más preferiblemente de 1×10^{-11} M o menos; y/o una constante de velocidad K_{off} de 5×10^{-1} a $1 \times 10^{-7} \text{ S}^{-1}$, preferiblemente de 1×10^{-2} a $1 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$, más preferiblemente de 5×10^{-3} a $1 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$, por ejemplo de $5 \times 10^{-1} \text{ S}^{-1}$ o menos, preferiblemente de $1 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$ o menos, ventajosamente de $1 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ o menos, más preferiblemente de $1 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ o menos, más preferiblemente todavía de $1 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ o menos, y lo más preferiblemente de $1 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$ o menos, preferiblemente según se determina por resonancia por plasmones superficiales.

Preferiblemente, el ligando de monómero dAb neutraliza TNF α en un ensayo estándar (p. ej., los ensayos L929 o HeLa descritos en la presente memoria) con DN50 de 500 nM a 50 pM, preferiblemente de 100 nM a 50 pM, más preferiblemente de 10 nM a 100 pM, ventajosamente de 1 nM a 100 pM; por ejemplo de 50 nM o menos, preferiblemente de 5 nM o menos, más preferiblemente de 500 pM o menos, ventajosamente de 200 pM o menos, y lo más preferiblemente de 100 pM o menos.

Preferiblemente, el ligando o monómero dAb inhibe la unión de TNF alfa con receptor TNF alfa I (receptor p55) con un CI50 de 500 nM a 50 pM, preferiblemente de 100 nM a 50 pM, más preferiblemente de 10 nM a 100 pM, ventajosamente de 1 nM a 100 pM; por ejemplo 50 nM o menos, preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 500 pM o menos, ventajosamente 200 pM o menos, y lo más preferiblemente 100 pM o menos.

5 Preferiblemente, el receptor TNF I diana es TNF α humano.

Además, la descripción en la presente memoria proporciona un monómero dAb (o ligando específico doble que comprende dicho dAb) que está unido a albúmina sérica (SA) con una Kd de 1 nM a 500 μ M (es decir, 1×10^{-9} a 5×10^{-4}), preferiblemente de 100 nM a 10 μ M. Preferiblemente, para un ligando específico doble que comprende un primer dAb anti-SA y un segundo dAb con otra diana, la afinidad (p. ej. Kd y/o K_{off} medida por resonancia por plasmones superficiales, p. ej. usando Biacore) del segundo dAb para su diana es de 1 a 100.000 veces (preferiblemente 100 a 100.000, más preferiblemente de 1.000 a 100.000 o de 10.000 a 100.000 veces) la afinidad del primer dAb para SA. Por ejemplo, el primer dAb se une a SA con una afinidad de aproximadamente 10 μ M, mientras que el segundo dAb se une a su diana con una afinidad de 100 pM. Preferiblemente, la albúmina sérica es albúmina sérica humana (HSA).

10 En una realización, el primer dAb (o un monómero dAb) se une a SA (p. ej., HSA) con una Kd de aproximadamente 50, preferiblemente 70, y más preferiblemente 100, 150 o 200 nM.

Por otra parte la descripción proporciona dímeros, trímeros y polímeros de los monómeros dAb antes mencionados.

Los ligandos de acuerdo con la invención, que incluyen monómeros, dímeros y trímeros de dAb, pueden estar ligados a una región Fc de anticuerpos, que comprende uno o los dos dominios de C_H2 y C_H3, y opcionalmente una región bisagra. Por ejemplo, para preparar dichos polipéptidos pueden usarse vectores que codifican ligandos unidos como una única secuencia de nucleótidos a una región Fc.

En una realización preferida de la segunda configuración, los dominios de unión a epítopos son dominios variables de inmunoglobulinas y se seleccionan entre repertorios de genes V de dominios individuales. En general el repertorio de dominios de anticuerpos individuales se presenta en la superficie de bacteriófagos filamentosos. En una realización preferida cada dominio de anticuerpos individual se selecciona por unión de un repertorio de fagos a un antígeno.

La presente descripción proporciona además un kit que comprende al menos un ligando multiespecífico según la presente invención, que puede ser un ligando de conformación abierta o conformación cerrada. Los kits pueden ser, por ejemplo, kits de diagnóstico, kits terapéuticos, kits para la detección de especies químicas o biológicas, y similares.

En un aspecto adicional más de la segunda configuración, la presente invención proporciona un inmunoensayo homogéneo que utiliza un ligando de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional más de la segunda configuración, la presente invención proporciona una composición que comprende un ligando multiespecífico de conformación cerrada, que puede obtenerse mediante un método descrito en la presente memoria, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por otra parte, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad usando un 'ligando multiespecífico de conformación cerrada' o una composición descrita en la presente memoria.

En una realización preferida, la enfermedad es cáncer o una enfermedad inflamatoria, p. ej. artritis reumatoide, asma o enfermedad de Crohn.

40 En un aspecto adicional de la segunda configuración, la presente descripción proporciona un método para el diagnóstico, que incluye el diagnóstico de una enfermedad usando un ligando multiespecífico de conformación cerrada, o una composición descrita en la presente memoria. Así en general la unión de un analito a un ligando multiespecífico de conformación cerrada puede aprovecharse para desplazar a un agente, lo que conduce a la generación de una señal en desplazamiento. Por ejemplo, la unión del analito (segundo antígeno) podría desplazar una enzima (primer antígeno) unida al anticuerpo que proporciona la base para un inmunoensayo, especialmente si la enzima se mantuviera en el anticuerpo a través de su sitio activo.

Así en un aspecto final de la segunda configuración, la presente descripción proporciona un método para detectar la presencia de una molécula diana, que comprende:

50 (a) suministro de un ligando multiespecífico de conformación cerrada unido a un agente, siendo dicho ligando específico para la molécula diana y el agente, en donde el agente que está unido por el ligando conduce a la generación de una señal detectable en desplazamiento desde el ligando;

(b) exposición del ligando multiespecífico de conformación cerrada a la molécula diana; y

(c) detección de la señal generada como consecuencia del desplazamiento del agente.

Según el aspecto anterior, ventajosamente, el agente es una enzima, que está inactiva cuando se une mediante el ligando multiespecífico de conformación cerrada. Alternativamente, el agente puede ser uno cualquiera o más seleccionados entre el grupo que consiste en los siguientes: el sustrato para una enzima, y una molécula fluorescente, luminiscente o cromógena que está inactiva o que se desactiva al unirse mediante el ligando.

- 5 Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencias" o "similitud" entre dos secuencias (estas expresiones se usan indistintamente en la presente memoria) se realizan del modo siguiente. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en uno o los dos entre un primer y un segundo aminoácido o secuencia de ácidos nucleicos para la alineación óptima y pueden desestimarse las secuencias no homólogas con fines de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia
- 10 alineada con fines de comparación es al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 40 %, más preferiblemente al menos el 50 %, incluso más preferiblemente al menos el 60 %, e incluso más preferiblemente al menos el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácidos o nucleótido como
- 15 la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se emplea en la presente memoria la "homología" aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos). La identidad porcentual entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias.
- 20 Ventajosamente, se emplea el algoritmo BLAST (versión 2.0) para alineación de secuencias, con parámetros establecidos como valores por omisión. El algoritmo BLAST se describe en detalle en el sitio web ("www") del National Center for Biotechnology Information ("NCBI") de los National Institutes of Health ("NIH") del gobierno de EE.UU. ("gov"), en el directorio "/Blast/", en el archivo "blast_help.html". Los parámetros de revisión se definen del modo siguiente, y ventajosamente se fijan como parámetros por omisión definidos.
- 25 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es el algoritmo heurístico de revisión empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx; estos programas asignan significación a sus hallazgos por medio de los métodos estadísticos de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2264-8 (véase el archivo "blast_help.html", como se describió anteriormente) con algunas mejoras. Los programas BLAST se adaptaron para búsqueda de similitud de secuencias, por ejemplo para identificar homólogos para una secuencia de revisión. Los
- 30 programas en general no son útiles para búsqueda de estilos de motivos. Para una exposición de las cuestiones básicas sobre búsqueda de similitud en bases de datos de secuencias, consúltese Altschul *et al.* (1994).

Los cinco programas BLAST disponibles en la página web del National Center for Biotechnology Information realizan las siguientes tareas:

"blastp" compara una secuencia de aminoácidos de revisión con una base de datos de secuencias de proteínas;

- 35 "blastn" compara una secuencia de nucleótidos de revisión con una base de datos de secuencias de nucleótidos;

"blastx" compara los productos de traducción conceptual de seis marcos de una secuencia de nucleótidos de revisión (las dos cadenas) con una base de datos de secuencias de proteínas;

"tblastn" compara una proteína secuencia de revisión con una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida dinámicamente en los seis marcos de lectura (las dos cadenas);

- 40 "tblastx" compara las traducciones de seis marcos de una secuencia de nucleótidos de revisión con las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos.

BLAST emplea los siguientes parámetros de revisión:

HISTOGRAM Muestra un histograma de puntuaciones para cada búsqueda; el valor por omisión es sí. (Véase parámetro H en el Manual de BLAST).

- 45 DESCRIPTIONS Limita el número de descripciones breves de secuencias emparejadas referidas al número especificado; el límite por omisión es 100 descripciones. (Véase parámetro V en la página del manual). Véase también EXPECT y CUTOFF.

- ALIGNMENTS Limita las secuencias de bases de datos al número especificado para el cual se refieren pares de segmentos de alta puntuación (HSP); el límite por omisión es 50. Si un número mayor de secuencias de bases de
- 50 datos cumple el umbral de significación estadística para la comunicación (véase EXPECT y CUTOFF más adelante), solo se comunican las correspondencias adscritas a la mayor significación estadística. (Véase parámetro B en el Manual de BLAST).

EXPECT El umbral de significación estadística para comunicar correspondencias con secuencias de la base de datos; el valor por omisión es 10, de manera que es de esperar que 10 correspondencias se encuentren por

casualidad, según el modelo estocástico de Karlin y Altschul (1990). Si la significación estadística adscrita a una correspondencia es mayor que el umbral EXPECT, la correspondencia no se comunicará. Los umbrales EXPECT inferiores son más severos, lo que lleva a la comunicación de menos correspondencias por casualidad. Son aceptables valores fraccionarios. (Véase parámetro E en el Manual de BLAST).

- 5 CUTOFF Puntuación de corte para comunicar pares de segmentos de alta puntuación. El valor por omisión se calcula a partir del valor EXPECT (véase antes). Se comunican los valores de HSP para una secuencia de bases de datos solo si la significación estadística adscrita a ellas es al menos tan alta como se adscribiría a un valor de HSP en solitario que tiene una puntuación igual al valor de CUTOFF. Los valores de CUTOFF más elevados son más severos, lo que conduce a la comunicación de menos correspondencias por casualidad. (Véase parámetro S en el Manual de BLAST). Normalmente, los umbrales de significación pueden manejarse más intuitivamente mediante EXPECT.

- 15 MATRIX Especifica una matriz de puntuaciones alternativa para BLASTP, BLASTX, TBLASTN y TBLASTX. La matriz por omisión es BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22):10915-9). Las elecciones alternativas válidas incluyen: PAM40, PAM120, PAM250 e IDENTIFY. No existen matrices de puntuación alternativas disponibles para BLASTN; para especificar la directiva MATRIX en BLASTN se debe devolver una respuesta al error.

STRAND Limita la búsqueda TBLASTN a la cadena superior o inferior de las secuencias de la base de datos; o limita la búsqueda BLASTN, BLASTX o TBLASTX a solo los marcos de lectura de la cadena superior o inferior de la secuencia de revisión.

- 20 FILTER Enmascara segmentos de la secuencia de revisión que tienen baja complejidad de cálculo según determina el programa SEG de Wootton & Federhen (1993) Computers and Chemistry 17:149-163, o segmentos consistentes en repeticiones internas de baja periodicidad, determinado por el programa XNU de Claverie & States, 1993, Computers and Chemistry 17:191-201, o, para BLASTN, por el programa DUST de Tatusov y Lipman (véase la página web de NCBI). El filtrado puede eliminar informes estadísticamente significativos pero sin interés biológico de la salida de blast (p. ej., impactos frente a regiones comunes ricas en colina, ácidas o básicas), lo que deja las regiones biológicamente más interesantes de la secuencia de revisión disponibles para correspondencia específica frente a secuencias de la base de datos.

- 30 La secuencia de baja complejidad encontrada por un programa de filtro es sustituida usando la letra "N" en las secuencias de nucleótidos (p. ej., "N" repetido 13 veces) y la letra "X" en las secuencias de proteínas (p. ej., "X" repetido 9 veces).

El filtrado se aplica solo a la secuencia de revisión (o sus productos de traducción), no a secuencias de la base de datos. El filtrado por omisión es DUST para BLASTN, SEG para otros programas.

- 35 No es infrecuente que con SEG, XNU o ambos no se enmascare nada cuando se aplican a secuencias en SWISS-PROT, de manera que no es de esperar que el filtrado siempre produzca un efecto. Además, en algunos casos, las secuencias se enmascaran en su totalidad, lo que indica que debe sospecharse de la significación estadística de cualquier correspondencia comunicada frente a la secuencia de revisión no filtrada.

NCBI-gi Hace que se muestren los identificadores gi de NCBI en la salida, además del nombre de acceso y/o lugar.

Es más preferible que las comparaciones de secuencia se realicen usando el algoritmo de revisión BLAST sencillo proporcionado en la página web de NCBI descrita anteriormente, en el directorio "/BLAST".

40 Breve descripción de las figuras

Figura 13 Secuencia VH de entrenamiento para biblioteca 1. La secuencia del marco VH basada en la secuencia de línea germinal DP47 - JH4b. Las posiciones en que la aleatorización NNK (N = nucleótidos A o T o C o G; K = nucleótidos G o T) se ha incorporado en la biblioteca 1 se indican en el texto en **negrita subrayada**.

- 45 Figura 14 Secuencia VH de entrenamiento para biblioteca 2. La secuencia del marco VH basada en la secuencia de línea germinal DP47 - JH4b. Las posiciones en que la aleatorización NNK (N = nucleótidos A o T o C o G; K = nucleótidos G o T) se ha incorporado en la biblioteca 2 se indican en el texto en **negrita subrayada**.

Figura 15 Secuencia Vk de entrenamiento para biblioteca 3. La secuencia del marco Vk basada en la secuencia de línea germinal DP_K9 - J_K1. Las posiciones en que la aleatorización NNK (N = nucleótidos A o T o C o G; K = nucleótidos G o T) se ha incorporado en la biblioteca 3 se indican en el texto en **negrita subrayada**.

- 50 Figura 16 Nucleótido y secuencia de aminoácidos de dAb anti MSA MSA 16 y MSA 26.

Figura 17 Inhibición Biacore de MSA 16 y 26. Se analizaron dAb purificados MSA16 y MSA26 por inhibición Biacore para determinar K_d. Brevemente, los dAb se sometieron a ensayo para determinar la concentración de dAb necesaria para conseguir 200 RU de respuesta en un chip de Biacore CM5 recubierto con alta densidad de MSA. Una vez determinadas las concentraciones requeridas de dAb, se premezcló antígeno MSA en un intervalo de

concentraciones en torno a la Kd esperada con el dAb y se incubó durante toda la noche. A continuación se midió la unión al chip de Biacore recubierto con MSA de dAb en cada una de las premezclas con una alta velocidad de flujo de 30 µl/minuto.

Figura 18 Niveles séricos de MSA16 después de inyección. Se determinó la semivida en suero del dAb MSA16 en ratón. Se dosificó la MSA16 como inyecciones i.v. individuales a aproximadamente 1,5 mg/kg en ratones CD1. La modelización con un modelo de 2 compartimentos mostró que MSA16 tenía un valor $t_{1/2\alpha}$ de 0,98 h, un $t_{1/2\beta}$ de 36,5 h y un ABC de 913 h.mg/ml. MSA16 tenía una semivida considerablemente alargada en comparación con HEL4 (un dAb de antilisozima de clara de huevo de gallina) que tenía un $t_{1/2\alpha}$ de 0,06 h y un $t_{1/2\beta}$ de 0,34 h.

Figura 19 ELISA (a) y ensayo de receptores de TNF (c) que muestran la inhibición de la unión de TNF con un fragmento de tipo Fab que comprende MSA26Ck y TAR1-5-19CH. La adición de MSA con el fragmento de tipo Fab reduce el nivel de inhibición. Se sondeó una placa ELISA recubierta con 1 mg/ml de TNF α con fragmento de tipo Fab específico doble C_H de V_K y C_K de V_K y también con un dAb de unión a TNF α de control a una concentración calculada para proporcionar una señal similar en ELISA. Se usaron los dAb específicos dobles y de control para sondear la placa ELISA en presencia y en ausencia de 2 mg/ml de MSA. Se redujo la señal en el pocillo específico doble en más del 50 % pero la señal en el pocillo de dAb no se redujo nada (véase figura 19a). Se colocó también la misma proteína específica doble en el ensayo de receptor con y sin MSA y se mostró también competencia por MSA (véase figura 19c). Esto demuestra que la unión de MSA con el específico doble es competitiva con la unión a TNF α .

Figura 20 Ensayo de receptores de TNF que muestra inhibición de la unión a TNF con un heterodímero con enlace de disulfuro de dAb de TAR1-5-19 y dAb de MSA16. La adición de MSA con el dímero reduce el nivel de inhibición de forma dependiente de la dosis. El ensayo de receptores de TNF (figura 19 (b)) se realizó en presencia de una concentración de heterodímero constante (18 nM) y una serie de dilución de MSA y HSA. La presencia de HSA en un intervalo de concentraciones (de hasta 2 mg/ml) no originó una reducción en la capacidad del dímero de inhibir TNF α . Sin embargo, la adición de MSA provocó una reducción dependiente de la dosis en la capacidad del dímero de inhibir TNF α (figura 19a). Esto demuestra que MSA y TNF α compiten por la unión al dímero MSA16 TAR1-5-19 unido en cis. MSA y HSA en solitario no tuvieron efectos en el nivel de unión a TNF en el ensayo.

Figura 21 Dominios de albúmina sérica humana (HSA) recombinantes purificados, las pistas 1-3 contienen dominios HSA I, II y III, respectivamente.

Figura 22 Ejemplo de una inmunoprecipitación que muestra que el dAb de unión a HSA se une a HSA de longitud completa (pista 8) y dominio HSA II (pista 6), pero no se une a los dominios HSA I y III (pistas 5 y 7, respectivamente). Un dAb de no unión a HSA no rebaja HSA de longitud completa o dominios HSA I, II o III (pistas 1-4).

Figura 23. Ejemplo de identificación de unión a un dominio HSA por un dAb identificado por resonancia por plasmones superficiales. El dAb en estudio se inyectó como se describe en un chip sensor de CM5 de albúmina sérica humana recubierto de baja densidad (Biacore). En el punto 1, el dAb en estudio se inyectó en solitario a 1 µM. En el punto 2, usando la orden de coinyección, se cambió la misma inyección a una mezcla de dAb 1 µM más HSA dominio 1, 2 o 3 7 µM, producido en *Pichia*. En el punto 3, se interrumpió la inyección de muestra, y continuó el flujo de tampón. Los resultados para dos dAb diferentes se muestran en 23 a) y 23 b). Cuando el dAb se inyecta con el dominio HSA al que se une, forma un complejo que ya no puede unirse a HSA en el chip, y por ello la señal Biacore disminuye en el punto 2, con una pérdida de velocidad que refleja el equilibrio entre vías entre dAb, dominio HSA soluble y chip unido a HSA. Cuando el dominio no se une al dAb, la señal permanece sin cambios en el punto 2, y empieza a descender solo en el punto 3, en el que el flujo se cambia al tampón. En estos dos casos, el dAb se une al dominio HSA 2.

Figura 24 Secuencias de anticuerpos de clones AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) identificados por selección de fagos. Todos los clones se han alineado en los genes de línea germinal humana. Los residuos que son idénticos a la línea germinal se han representado por '.'. En CDR3 VH, se ha usado el símbolo 'a-' para facilitar la alineación, pero no representa un residuo. Todos los clones se seleccionaron entre bibliotecas basadas en un único marco humano que comprende los genes de línea germinal de cadena pesada V3-23/DP47 y JH4b para las bibliotecas VH y los genes de cadena ligera κ O12/O2/DPK9 y Jk1 para las bibliotecas Vk con diversidad de cadenas laterales incorporadas en posiciones del sitio de unión a antígeno.

Figura 25 Alineaciones de los tres dominios de albúmina sérica humana. Puede observarse claramente la conservación de los residuos de cisteína.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

"Complementario" Dos dominios de inmunoglobulinas son "complementarios" cuando pertenecen a familias de estructuras que forman pares o grupos semejantes o se obtienen de dichas familias y conservan esta característica. Por ejemplo, un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo son complementarios; dos dominios V_H no son complementarios y dos dominios V_L no son complementarios. Pueden encontrarse dominios complementarios en

otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como los dominios V α y V β (γ y δ) del receptor de linfocitos T. En el contexto de la segunda configuración de la presente invención, los dominios no complementarios no se unen una molécula diana cooperativamente, pero actúan independientemente en diferentes epítomos diana que pueden estar en la misma o en diferentes moléculas. Los dominios que son artificiales, como los dominios
5 basados en armazones de proteínas que no se unen epítomos salvo que se diseñen con este fin, no son complementarios. Análogamente, dos dominios basados (por ejemplo) en un dominio de inmunoglobulinas y un dominio de fibronectinas no son complementarios.

"Inmunoglobulina" Se refiere a una familia de polipéptidos que conserva el plegamiento de inmunoglobulinas característico de las moléculas de anticuerpos, que contiene dos hojas β y, normalmente, un enlace de disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas intervienen en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares *in vivo*, lo que incluye amplias funciones en el sistema inmunitario (por ejemplo, anticuerpos, moléculas de receptores de linfocitos T y similares), implicación en la adhesión celular (por ejemplo las moléculas ICAM) y señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, como el receptor PDGF). La presente invención es aplicable a todas las moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas que
15 poseen dominios de unión. Preferiblemente, la presente invención se refiere a anticuerpos.

"Combinación" Los dominios variables según la invención se combinan para formar un grupo de dominios; por ejemplo, los dominios complementarios pueden combinarse, por ejemplo combinando dominios V_L con dominios V_H. Los dominios no complementarios también pueden combinarse. Los dominios pueden combinarse de diversas formas, que implican la unión de los dominios por medios covalentes o no covalentes.

"Dominio" Un dominio es una estructura de proteínas plegada que conserva su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades discretas funcionales de las proteínas, y en muchos casos pueden añadirse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio.

Como se emplea en la presente memoria, un "dominio variable individual" es un dominio que puede unirse
25 específicamente a un epítomo, un antígeno o un ligando independientemente, es decir, sin necesidad de que otro dominio de unión se una cooperativamente al epítomo, antígeno o ligando. Dicho epítomo, antígeno o ligando puede ser de ocurrencia natural, o puede ser una modificación de un epítomo, antígeno o ligando de ocurrencia natural, o puede ser sintético. La parte "variable" del dominio variable individual determina esencialmente la especificidad de unión de cada dominio variable individual en particular. Así, el término "variable" en el contexto de los dominios
30 variables individuales, se refiere al hecho de que la variabilidad de secuencias no se distribuye uniformemente a través de un dominio variable individual, sino que se distribuye esencialmente entre las partes de marco o esqueleto del dominio variable individual. Por ejemplo, en un dominio variable individual de anticuerpos, la variabilidad se concentra en de uno a tres segmentos conocidos comúnmente como regiones de determinación de complementariedad (CDR). La una o más CDR pueden distribuirse entre las regiones de estructura principal del anticuerpo (FR) de una cadena ligera o de una cadena pesada para formar un dominio variable individual de cadena ligera de anticuerpos o un dominio variable individual de cadena pesada de anticuerpos, respectivamente, cada uno de los cuales se une específicamente a un epítomo independientemente de otro dominio de unión. De estructura análoga existe un dominio variable individual de receptor de linfocitos T, con sus de una a tres CDR distribuidas entre los dominios marco de TCR.

40 Así, las partes variables que confieren la especificidad de unión de dominios variables individuales pueden diferir extensamente en secuencia de otros dominios variables individuales que tienen sustancialmente la misma parte de armazón restante, y por consiguiente, pueden tener un intervalo de especificidades de unión diverso. Los armazones de dominios variables individuales incluyen armazones de la estructura principal del anticuerpo, estructuras principales de anticuerpos de consenso y armazones que se originan y/o proceden de proteínas bacterianas, p. ej.
45 GroEL, GroEs, SpA, SpG, y de proteínas eucarióticas, p. ej., CTLA-4, lipocalinas, fibronectina, etc. Una fuente de las partes variables de dominios variables individuales incluye una o más CDR, que pueden injertarse en armazones no de inmunoglobulinas así como armazones de estructuras principales del anticuerpo para generar dominios variables individuales de anticuerpos. Otra fuente de variación en un dominio variable individual puede ser la diversificación de posiciones elegidas en un armazón marco no de inmunoglobulinas como fibronectina, para generar dominios
50 variables individuales, usando técnicas de biología molecular, como diversidad de codones NNK. Análogamente, esta fuente de variación es aplicable también a un dominio variable individual de anticuerpos.

Un dominio variable individual de anticuerpos puede obtenerse de secuencias de anticuerpos codificadas y/o generadas por una especie productora de anticuerpos, e incluye fragmento o fragmentos y/o derivados de la región variable de anticuerpos, incluyendo una o más regiones marco, o secuencias de consenso marco, y/o una o más
55 CDR. Por consiguiente, un dominio variable individual de anticuerpos incluye fragmentos y/o derivados de una región variable de cadena ligera de anticuerpos, o de una región variable de cadena pesada de anticuerpos, o de una región de anticuerpos VHH. Por ejemplo, las regiones de anticuerpos VHH incluyen aquéllas que son endógenas de los camélidos: p. ej., camellos y llamas, y el nuevo receptor de antígenos (NAR) de tiburones nodriza u oreotolóbidos (Roux *et al.*, 1998 PNAS 95(20):11804-9) y la región VH de pez rata manchado (Rast *et al.*, 1998
60 Immunogenetics 47:234-245). Los dominios variables de cadena ligera de anticuerpos y los dominios variables de cadena pesada de anticuerpos incluyen los endógenos de una especie animal que incluye, pero preferiblemente no

se limita a, ser humano, ratón, rata, porcino, cynomolgus, hámster, caballo, vaca, cabra, perro, gato y aves, p. ej. VKappa humano y VH3 humano, respectivamente. Las regiones variables de cadena ligera de anticuerpos y las regiones variables de cadena pesada de anticuerpos, también incluyen una estructura principal de anticuerpos de consenso, como se describe más abajo, que incluye las familias de la región V, como la familia VH3. Un dominio variable individual de receptor de linfocitos T es un dominio variable individual que procede de una cadena o cadenas de receptor de linfocitos T, p. ej., cadenas α , β , γ y δ , y que se unen a un epítipo o un antígeno o un ligando independientemente de otro dominio de unión para ese epítipo, antígeno o ligando, de forma análoga a los dominios variables individuales de anticuerpos.

Un dominio variable individual de anticuerpos comprende también un dominio de proteínas que comprende un armazón que no se deriva de un anticuerpo o a receptor de linfocitos T, y que ha sido diseñado genéticamente para mostrar la diversidad en la especificidad de unión con respecto a un estado anterior al diseño, incorporando en el armazón, uno o más de una CDR1, una CDR2 y/o una CDR3, un derivado o un fragmento de las mismas, o un dominio de anticuerpos V completo. Un dominio variable individual de anticuerpos también puede incluir un armazón no de inmunoglobulinas y armazones de inmunoglobulinas como se ilustra en los multímeros de dominio variable individual GroEL descritos más abajo. Preferiblemente la o las CDR proceden de un dominio de anticuerpos V de una cadena de anticuerpos, p. ej., VH, VL y VHH. La cadena de anticuerpos puede unirse específicamente a un antígeno o epítipo en concierto con una segunda cadena de anticuerpos, o bien la cadena de anticuerpos puede unirse específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de una segunda cadena de anticuerpos, como una cadena VHH. La integración de una o más CDR en un dominio variable individual de anticuerpos que comprende un armazón no de inmunoglobulinas debe derivar en la capacidad del dominio variable individual del armazón de no inmunoglobulinas de unirse específicamente a un epítipo o un antígeno o un ligando independientemente de otro dominio de unión para ese epítipo, antígeno o ligando.

Un dominio individual se transforma en un dominio variable individual introduciendo diversidad en el o los sitios diseñados para convertirse en sitios de unión, seguido por la selección de características de unión deseadas usando, por ejemplo, tecnologías de presentación. Puede introducirse diversidad en sitios específicos de un armazón de no inmunoglobulinas de interés aleatorizando la secuencia de aminoácidos de lazos específicos del armazón, p. ej. introduciendo codones NNK. Este mecanismo de generación de diversidad seguido por la selección de características de unión deseadas es similar a la selección natural de anticuerpos específicos de antígenos de alta afinidad que proceden de la diversidad generada en los lazos que conforman el sitio de unión a anticuerpos de la naturaleza. Idealmente, un dominio individual que es pequeño y contiene un plegamiento similar al de un lazo de anticuerpos, se transforma en un dominio variable individual, se expresan variantes del dominio variable individual a partir de las cuales pueden seleccionarse dominios variables individuales que contienen especificidades y características de unión deseadas entre bibliotecas que contienen un gran número de variantes del dominio variable individual.

Nomenclatura de los dominios variables individuales: a veces la nomenclatura de un dominio variable individual de anticuerpos se abrevia retirando la primera "d" o las letras "Dom", por ejemplo, Ab7h24 es idéntico a dAb7h24 que es idéntico a DOM7h24.

Por dominio variable individual de anticuerpos se entiende un dominio de polipéptidos plegado que comprende secuencias características de dominios de anticuerpos variables. Por tanto incluye dominios de anticuerpos variables completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más lazos han sido sustituidos por secuencias que no son características de dominios de anticuerpos variables, o dominios de anticuerpos variables que han sido truncados o comprenden extensiones en el extremo N o C, así como fragmentos plegados de dominios variables que conservan al menos en parte la unión actividad y especificidad del dominio de longitud completa.

"Repertorio" Colección de diversas variantes, por ejemplo variantes de polipéptidos que difieren en su secuencia primaria. Una biblioteca usada en la presente invención comprenderá un repertorio de polipéptidos que comprende al menos 1.000 miembros.

"Biblioteca" El término biblioteca se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca está compuesta por miembros, cada uno de los cuales tiene una única secuencia de polipéptidos o de ácidos nucleicos. En este sentido, *biblioteca* es sinónimo de *repertorio*. Las diferencias de secuencias entre los miembros de una biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede adoptar la forma de una mezcla sencilla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacteria, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene solo uno o un número limitado de miembros de la biblioteca. Ventajosamente, los ácidos nucleicos están incorporados en vectores de expresión, con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por tanto, una biblioteca puede tomar la forma de una población de organismos hospedadores, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un único miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su miembro de polipéptidos correspondiente. Así, la población de organismos hospedadores tiene la posibilidad de codificar un gran repertorio de variantes de polipéptido genéticamente diversas.

Un "ligando multiespecífico de conformación cerrada" describe un ligando multiespecífico como se define en la

presente memoria que comprende al menos dos dominios de unión a epítomos como se define en la presente memoria. La expresión 'conformación cerrada' (ligando multiespecífico) significa que los dominios de unión a epítomos del ligando están dispuestos de manera que la unión a epítomos por un dominio de unión a epítomos compite con la unión a epítomos por otro dominio de unión a epítomos. Es decir, los epítomos semejantes pueden estar unidos por cada dominio de unión a epítomos individualmente pero no simultáneamente. La conformación cerrada del ligando puede conseguirse usando los métodos descritos en la presente memoria.

"Anticuerpo" Un anticuerpo (por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE) o fragmento (como Fab, F(ab')₂, Fv, Fv con enlace de disulfuro, scFv, anticuerpo específico de conformación cerrada, scFv con enlace de disulfuro, diacuerpo) ya provenga de cualquier especie que produce naturalmente un anticuerpo o se cree mediante tecnología de ADN recombinante; aislado a partir de suero, linfocitos B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias).

"Ligando específico doble" Un ligando que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulinas y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulinas como se define en la presente memoria, en donde los dominios variables son capaces de unirse a dos antígenos diferentes o dos epítomos en el mismo antígeno que normalmente no están unidos por una inmunoglobulina mono-específica. Por ejemplo, los dos epítomos pueden estar en el mismo hapteno, pero no están en el mismo epítomo o suficientemente adyacentes para estar unidos por un ligando mono-específico. Los ligandos específicos dobles según la invención están compuestos por dominios variables que tienen diferentes especificidades, y no contienen mutuamente pares de dominios variables complementarios que tienen la misma especificidad. Así, los ligandos específicos dobles, que como se define en la presente memoria, contienen dos dominios variables individuales, son un subconjunto de ligandos multiméricos, que como se define en la presente memoria contienen dos o más dominios variables individuales, en donde al menos dos de los dominios variables individuales son capaces de unirse a dos antígenos diferentes o a dos epítomos diferentes en el mismo antígeno. Además, un ligando específico doble como se define en la presente memoria es también distinto de un ligando que comprende un dominio variable individual de anticuerpos, y un segundo antígeno y/o dominio de unión a epítomos que no es un dominio variable individual. Asimismo, un ligando específico doble como se define en la presente memoria es también distinto de un ligando que contiene un primer y un segundo antígeno/dominio de unión a epítomos, en el que el antígeno/dominio de unión a epítomos no es un dominio variable individual como se define en la presente memoria.

"Antígeno" Una molécula que está unida por un ligando según la presente invención. Normalmente, los antígenos están unidos por ligandos de anticuerpos y son capaces de elevar la respuesta de un anticuerpo *in vivo*. Puede tratarse de un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula. En general, los ligandos específicos dobles según la invención se seleccionan por su especificidad con respecto a la diana frente a un antígeno determinado. En el caso de anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos, el sitio de unión a anticuerpos definido por los lazos variables (L1, L2, L3 y H1, H2, H3) puede unirse al antígeno.

"Epítomo" Una unidad de estructura unida convencionalmente por un par de inmunoglobulinas V_H/V_L. Los epítomos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo, y así representan la diana de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio individual, un epítomo representa la unidad de estructura unida por un dominio variable aislado. Un dominio de unión a epítomos comprende un armazón de proteínas y sitios de interacción de epítomos (que están ventajosamente en la superficie del armazón de proteínas). Un dominio de unión a epítomos puede comprender sitios de interacción de epítomos que son no lineales, p. ej. en los que el dominio de unión a epítomos comprende múltiples sitios de interacción de epítomos que tienen regiones intermedias entre ellos, p. ej., CDR separadas por FR, o están presentes en cadenas de polipéptidos separadas. Alternativamente, un dominio de unión a epítomos puede comprender un sitio de interacción de epítomos lineal compuesto por aminoácidos codificados de forma continua en una cadena de polipéptidos.

"Ligando genérico" Un ligando que está unido a todos los miembros de un repertorio. En general, no se une a través del sitio de unión a antígeno como se definió anteriormente. Algunos ejemplos no limitativos incluyen proteína A, proteína L y proteína G.

"Selección" Obtenido por cribado, o procedente de un proceso de selección darwiniana, en el que las interacciones de unión tienen lugar entre un dominio y el antígeno o epítomo o entre un anticuerpo y un antígeno o epítomo. Así un primer dominio variable puede seleccionarse para unirse a un antígeno o epítomo en presencia o en ausencia de un dominio variable complementario.

"Marco universal" Secuencia de estructura principal del anticuerpo individual correspondiente a las regiones de un anticuerpo conservadas en secuencia como se define en Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services) o correspondiente al repertorio o estructura de inmunoglobulinas de la línea germinal humana como se define en Chothia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. La invención proporciona el uso de un único marco, o un conjunto de dichos marcos, que según se ha descubierto permite la obtención prácticamente de cualquier especificidad de unión a través de la variación en las regiones hipervariables en solitario.

Como se emplea en la presente memoria "conjugado" se refiere a una composición que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina sérica que está unida a un fármaco.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión "molécula pequeña" significa un compuesto que tiene un peso molecular de menos de 1.500 dalton, preferiblemente menos de 1.000 dalton.

Dichos conjugados incluyen "conjugados de fármacos", que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina sérica a la que un fármaco está unido covalentemente, y "conjugados de fármacos no covalentes", que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina sérica a la que un fármaco no está unido covalentemente.

Como se emplea en la presente memoria, "conjugado de fármacos" se refiere a una composición que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina sérica a la que está unido covalentemente un fármaco. El fármaco puede estar unido de forma covalente al fragmento de unión a antígeno directa o indirectamente a través de un resto de grupo enlazador adecuado. El fármaco puede estar unido al fragmento de unión a antígeno en cualquier posición adecuada, como el extremo amino, el extremo carboxilo o a través de cadenas laterales de aminoácidos adecuadas (p. ej., el grupo amino de lisina).

"Semivida" Tiempo que se invierte para que la concentración sérica del ligando se reduzca al 50 %, *in vivo*, por ejemplo debido a degradación del ligando y/o aclaramiento o secuestro del ligando por mecanismos naturales. Los ligandos de la invención se estabilizan *in vivo* y su semivida aumenta por la unión a moléculas que resisten la degradación y/o el aclaramiento o el secuestro. Normalmente, dichas moléculas son proteínas de ocurrencia natural que tienen en sí una larga semivida *in vivo*. La semivida de un ligando aumenta si persiste su actividad funcional, *in vivo*, durante un periodo más prolongado que un ligando similar que no es específico para la molécula que aumenta la semivida. Así, un ligando específico para HSA y una molécula diana se compara con el mismo ligando en el que no está presente la especificidad para HSA, que no se une a HSA pero que se une a otra molécula. Por ejemplo, puede unirse a un segundo epítipo en la molécula diana. Normalmente, la semivida aumenta en el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 % o más. Son posibles aumentos en el intervalo de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x o más de la semivida. Alternativamente, o además, son posibles aumentos en el intervalo de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x de la semivida.

La frase "sustancialmente la misma" cuando se emplea para comparar la semivida beta T de un ligando con la semivida beta T de albúmina sérica en un hospedador significa que la semivida beta T del ligando en un hospedador varía no más del 50 % con respecto a la semivida beta T de albúmina sérica en sí en el mismo hospedador, preferiblemente un hospedador humano, p. ej., la semivida beta T de dicho ligando es no más del 50 % menos o no más del 50 % mayor que la semivida beta T de albúmina sérica en un hospedador especificado. Preferiblemente, cuando se hace referencia a la frase "sustancialmente la misma", la semivida beta T del ligando en un hospedador varía no más del 20 % al 10 % con respecto a la semivida de albúmina sérica en sí, y más preferiblemente, varía no más del 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 % o el 1 %, o menos con respecto a la semivida de albúmina sérica en sí, o no varía nada con respecto a la semivida de albúmina sérica en sí.

Alternativamente, la frase "no sustancialmente la misma" cuando se emplea para comparar la semivida beta T de un ligando con la semivida beta T de albúmina sérica en un hospedador significa que la semivida beta T del ligando en un hospedador varía al menos el 50 % con respecto a la semivida beta T de albúmina sérica en sí en el mismo hospedador, preferiblemente un hospedador humano, p. ej., la semivida beta T del ligando es más del 50 % mayor que la semivida beta T de albúmina sérica en un hospedador especificado.

"Inmunoensayo homogéneo" Un inmunoensayo en el que analito se detecta sin necesidad de una etapa de separación de reactivos unidos o no unidos.

"Sustancialmente idéntica" o "sustancialmente homóloga" Una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (p. ej., con una cadena lateral similar, p. ej., sustituciones de aminoácidos conservadas) a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos de manera que las secuencias de aminoácidos o nucleótidos primera o segunda tienen actividades similares. En el caso de primeros y segundos anticuerpos y/o dominios variables individuales descritos en la presente memoria, el segundo anticuerpo o dominio variable individual tiene la misma especificidad de unión que el primero y tiene al menos el 50 %, o al menos hasta el 55 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de la afinidad del primer anticuerpo o dominio variable individual.

Como se emplea en la presente memoria, las expresiones "condiciones de severidad baja", "severidad media", "severidad alta", o "severidad muy alta" describen condiciones para hibridación y lavado de ácidos nucleicos. La orientación para realizar reacciones de hibridación puede encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. Se describen métodos acuosos y no acuosos en esa referencia y que pueden usarse. Las condiciones de hibridación específicas referidas en la presente memoria son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de severidad baja en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45 °C, seguido por dos lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55 °C para condiciones de severidad baja); (2) condiciones de hibridación de severidad media en SSC 6X a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 60 °C; (3) condiciones de hibridación de severidad alta en SSC 6X a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a

65 °C; y preferiblemente (4) condiciones de hibridación de severidad muy alta que son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido por uno o más lavados a SSC 0,2X, 1 % SDS a 65 °C. Las condiciones de severidad muy alta (4) son las condiciones preferidas y las que deben usarse salvo que se especifique lo contrario.

"Resonancia por plasmones superficiales" Los ensayos de competencia pueden usarse para determinar si un antígeno o epítipo específico, como albúmina sérica humana, compite con otro antígeno o epítipo, como albúmina sérica de cynomolgus, para la unión a un ligando de unión a albúmina sérica descrito en la presente memoria, como un dAb específico. Análogamente los ensayos de competencia pueden usarse para determinar si un primer ligando como dAb, compite con un segundo ligando como un dAb para la unión a un antígeno o epítipo diana. El término "compite" como se emplea en la presente memoria se refiere a una sustancia, como una molécula, compuesto, preferiblemente una proteína, que es capaz de interferir en alguna medida con la interacción de unión específica entre dos o más moléculas. La frase "no inhibe competitivamente" significa que la sustancia, como una molécula, un compuesto, preferiblemente una proteína, no interfiere en ninguna magnitud mensurable o significativa con la interacción de unión específica entre dos o más moléculas. La interacción de unión específica entre dos o más moléculas incluye preferiblemente la interacción de unión específica entre un dominio variable individual y su partícipe o diana semejante. La molécula de interferencia o competencia puede ser otro dominio variable individual o puede ser una molécula que es estructuralmente y/o funcionalmente similar a un partícipe o diana semejante.

Un dominio variable individual incluye un dominio variable individual de inmunoglobulinas y un dominio variable individual no de inmunoglobulinas que contiene una, dos, tres o más regiones CDR de dominio variable de inmunoglobulinas, como un dominio variable de anticuerpos, que incluye un dominio variable individual de cadena pesada o de cadena ligera de anticuerpos. El dominio variable individual puede obtenerse de un animal, que incluye un ser humano, rata, ratón, cerdo, mono, camélido, como una región variable (V) de anticuerpos, o puede obtenerse de un microorganismo como E. coli en el caso del armazón de no inmunoglobulina de GroEL y GroEs. Un dominio variable individual puede ser parcial o totalmente artificial, o puede generarse usando una tecnología de biología molecular recombinante.

Los ensayos de competencia *in vitro* para determinar la capacidad de un dominio variable individual para competir por la unión a una diana en otro dominio de unión a diana, como otro dominio variable individual, así como para determinar la K_d, son bien conocidos en la técnica. Un ensayo de competencia preferido es un ensayo de resonancia por plasmones superficiales, que tiene las ventajas de ser rápido, sensible y útil en un amplio intervalo de concentraciones de proteínas, y que requiere pequeñas cantidades de material de muestra. Un ensayo de competencia de resonancia por plasmones superficiales preferido es un experimento de competencia Biacore. Un experimento de competencia Biacore puede usarse para determinar si, por ejemplo, la albúmina sérica de cynomolgus y la albúmina sérica humana compiten por la unión a un ligando como dAb DOM7h-x. Un protocolo experimental para dicho ejemplo es el siguiente.

Por ejemplo, después del recubrimiento de un chip sensor CM5 (Biacore AB) a 25 °C con aproximadamente 1.000 unidades de resonancia (RU) de albúmina sérica humana (HSA), se inyecta un dAb purificado sobre la superficie del antígeno a una única concentración (p. ej., 1 μM) en solitario, y en combinación con una serie de dilución de la albúmina sérica de cynomolgus (CSA). Las diluciones en serie de HSA se mezclaron con una concentración constante (40 nM) del dAb purificado. Una serie de dilución adecuada de CSA consistiría en empezar con 5 μM CSA, con seis diluciones dobles hasta CSA 78 nM. Debe dejarse que estas soluciones alcancen el equilibrio antes de la inyección. Después de la inyección, se toma una lectura de respuesta para medir las RU de unión resultantes para el dAb en solitario y cada una de las diversas mezclas dAb/CSA, usando los datos de acuerdo con el software de evaluación BIA, genera una curva de dosis-respuesta para cada inhibición de CSA de la unión de AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) al chip en el que se inmoviliza la HSA. Comparando las RU unidas de dAb en solitario con las RU unidas de dAb + CSA, se podrá ver si la CSA compite con la HSA para unirse al dAb. Si existe competencia, entonces cuando la concentración de CSA en solución aumente, las RU de dAb unido a HSA disminuirán. Si no existe competencia, la adición de CSA no tendrá incidencia en la cantidad de dAb que está unido a HSA.

Un experto sabrá adaptar este u otros protocolos para realizar este ensayo de competencia en diversos ligandos diferentes, lo que incluye los distintos ligandos descritos en la presente memoria que se unen a albúmina sérica. La variedad de ligandos incluye, pero no se limita a, los dominios variables individuales de monómeros, que incluyen dominios variables individuales que comprenden un armazón de inmunoglobulinas y/o de no inmunoglobulinas, los dAb, ligandos específicos dobles y multímeros de estos ligandos. Un experto sabría también cómo adaptar este protocolo para comparar la unión de varios pares de antígenos y/o epítopos diferentes a un ligando usando este ensayo de competencia.

Estos experimentos de competencia pueden proporcionar un valor de corte numérico según el cual puede determinarse si un antígeno o epítipo compite con otro antígeno o epítipo para la unión a un ligando específico, preferiblemente a dAb. Por ejemplo, en el experimento descrito anteriormente, si CSA 5 μM en solución produce una reducción del 10 %, o inferior, reducción en RU de unión de dAb a HSA, entonces se considera que no hay competencia para la unión. Por consiguiente, una reducción en las RU de unión de dAb a HSA en presencia de CSA de más del 10 % indicaría la presencia de competencia para la unión del dAb para unión a HSA por CSA. Una reducción en las RU de unión de dAb a HSA de menos del 10 % indicaría la ausencia de competencia por CSA para

la unión de dAb a HSA, con reducciones del 9 %, el 8 %, el 7 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 % y el 1 % que son requisitos progresivamente más severos para indicar la ausencia de competencia. Cuanto mayor es la reducción en las RU de unión de dAb a HSA, más alta es la competencia. Así, los niveles crecientes de competencia pueden graduarse según la reducción porcentual en las RU de unión a HSA, es decir, al menos el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o hasta el 100 % de reducción.

Un fragmento como se emplea en la presente memoria se refiere a menos del 100 % de la secuencia (p. ej., hasta el 99 %, el 90 %, el 80 %, el 70 %, el 60 %, el 50 %, el 40 %, el 30 %, el 20 %, el 10 %, etc.), pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos contiguos. Un fragmento tiene suficiente longitud de manera que la unión a la albúmina sérica de interés se mantiene con una afinidad de 1×10^{-6} M o menos. Un fragmento como se emplea en la presente memoria también se refiere a inserciones, deleciones y sustituciones opcionales de uno o más aminoácidos que no alteran sustancialmente la capacidad del polipéptido alterado de unirse a un anticuerpo de dominio individual obtenido con respecto a la diana. El número de inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos es preferiblemente de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

Salvo que se establezca lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica (p. ej., en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas estándar para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en general, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. que se incorporan en la presente memoria como referencia) y métodos químicos. Las técnicas estándar para ensayos de resonancia por plasmones superficiales incluyen Jan Terje Andersen *et al.* (2006) *Eur. J. Immunol.* 36:304-3051 Fagerstam (1991) *Tech. Proteína Chem.* 2:65-71, y Johnsson *et al.* (1991) *Anal. Biochem* 198:268-277.

Preparación de ligandos multiespecíficos basados en inmunoglobulinas

Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria, ya tengan conformación abierta o cerrada según la configuración deseada, pueden prepararse según técnicas establecidas previamente, usadas en el campo del diseño de anticuerpos, para la preparación de scFv, anticuerpos de "fagos" y otras moléculas de anticuerpos diseñadas. Las técnicas para la preparación de anticuerpos, y en particular anticuerpos biespecíficos, se describen por ejemplo en las siguientes revisiones y en las referencias citadas en las mismas: Winter & Milstein, (1991) *Nature* 349:293-299; Plueckthun (1992) *Immunological Reviews* 130:151-188; Wright *et al.*, (1992) *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-168; Holliger, P. & Winter, G. (1993) *Curr. Op. Biotechn.* 4, 446-449; Carter, *et al.* (1995) *J. Hematother.* 4, 463-470; Chester, K.A. & Hawkins, R.E. (1995) *Trends Biotechn.* 13, 294-300; Hoogenboom, H.R. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 125-126; Fearon, D. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 618-619; Plückthun, A. & Pack, P. (1997) *Immunotechnology* 3, 83-105; Carter, P. & Merchant, A.M. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 449-454; Holliger, P. & Winter, G. (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* 45,128-130.

La descripción en la presente memoria proporciona la selección de dominios variables frente a dos antígenos o epítomos diferentes, y la combinación posterior de los dominios variables.

Las técnicas empleadas para la selección de los dominios variables emplean bibliotecas y procedimientos de selección que son conocidos en la técnica. Las bibliotecas naturales (Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Vaughan *et al.* (1996) *Nature Biotech.*, 14: 309) que usan genes V reordenados recogidos de linfocitos B humanos son bien conocidas para los expertos en la técnica. Las bibliotecas sintéticas (Hoogenboom & Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457; Nissim *et al.* (1994) *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths *et al.* (1994) *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruif *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.*, 248: 97) se preparan por clonación de genes V de inmunoglobulinas, normalmente usando PCR. Los errores den el proceso de PCR pueden conducir a un alto grado de aleatorización. Las bibliotecas V_H y/o V_L pueden seleccionarse frente a antígenos o epítomos diana por separado, en cuyo caso la unión al dominio individual se selecciona directamente para cada uno o en conjunto.

Un método preferido para preparar un ligando específico doble comprende el uso de un sistema de selección en el que se selecciona un repertorio de dominios variables para la unión a un primer antígeno o epítomo y se selecciona un repertorio de dominios variables para la unión a un segundo antígeno o epítomo. A continuación se combinan los dominios variables seleccionados primero y segundo y se selecciona el ligando específico doble para la unión al primer y segundo antígeno o epítomo. Los ligandos de conformación cerrada se seleccionan para la unión al antígeno o epítomo primero o segundo de forma aislada pero no simultánea.

A. Sistemas de vectores de bibliotecas

En la técnica se conoce una variedad de sistemas de selección que son adecuados para su uso en la presente invención. A continuación se describen ejemplos de dichos sistemas.

Los sistemas de expresión de bacteriófagos lambda pueden ser objeto directamente de cribado como placas de bacteriófagos o como colonias de lisógenos, como se ha descrito anteriormente (Huse *et al.* (1989) *Science*, 246: 1275; Caton y Koprowski (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87; Mullinax *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 8095; Persson *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 2432) y pueden usarse en la invención. Mientras
5 estos sistemas de expresión pueden usarse para el cribado de hasta 10^6 miembros diferentes de una biblioteca, en realidad no son adecuados para el cribado de números grandes (mayores que 10^6 miembros).

En la construcción de bibliotecas son de uso especial los sistemas de presentación de selección, que permiten unir un ácido nucleico al polipéptido que expresa. Como se emplea en la presente memoria, un sistema de presentación de selección es un sistema que permite la selección, por medios de presentación adecuados, de los miembros
10 individuales de la biblioteca por unión a los ligandos genéricos y/o diana.

En la técnica se conocen protocolos de selección para aislar miembros deseados de bibliotecas grandes, como los tipificados por técnicas de presentación de fagos. Dichos sistemas, en los que se muestran diversas secuencias peptídicas en la superficie de bacteriófagos filamentosos (Scott y Smith (1990) *Science*, 249: 386), se han mostrado
15 útiles para crear bibliotecas de fragmentos de anticuerpos (y las secuencias de nucleótidos que los codifican) para la selección y amplificación *in vitro* de fragmentos de anticuerpos específicos que se unen a antígeno diana (McCafferty *et al.*, documento WO-92/01047). Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones V_H y V_L están unidas a fragmentos genéricos que codifican señales delanteras que los dirigen al espacio periplásmico de *E. coli* y como consecuencia los fragmentos de anticuerpos resultantes se presentan en la superficie del bacteriófago, normalmente como fusiones con proteínas de recubrimiento de bacteriófagos (p. ej., pIII o pVIII). Alternativamente,
20 los fragmentos de anticuerpos se presentan externamente en cápsidas de fagos lambda (cuerpos de fagos). Una ventaja de los sistemas de presentación basados en fagos es que, debido a que son sistemas biológicos, los miembros de bibliotecas seleccionados pueden amplificarse simplemente haciendo crecer el fago que contiene el miembro de biblioteca seleccionado en células bacterianas. Además, dado que la secuencia de nucleótidos que codifican el miembro de biblioteca de polipéptidos está contenida en un vector de fagos o fagémidos, la
25 secuenciación, la expresión y la manipulación genética posterior son relativamente sencillas.

Los métodos para la construcción de bibliotecas de presentación de anticuerpos bacteriófagos y bibliotecas de expresión de fagos lambda son bien conocidos en la técnica (McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348: 552; Kang *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 4363; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624; Lowman *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Burton *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 10134; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acid Res.*, 19: 4133; Chang *et al.* (1991) *J. Immunol.*, 147: 3610; Breitling *et al.* (1991) *Gene*, 104: 147; Marks *et al.* (1991) más arriba; Barbas *et al.* (1992) más arriba; Hawkins y Winter (1992) *J. Immunol.*, 22: 867; Marks *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 16007; Lerner *et al.* (1992) *Science*, 258: 1313, incorporadas en la presente memoria como referencia).

Un enfoque especialmente ventajoso ha sido el uso de bibliotecas de fagos scFv (Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883; Chaudhary *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070; McCafferty *et al.* (1990) más arriba; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Chiswell *et al.* (1992) *Trends Biotech.*, 10: 80; Marks *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.*, 267). Se han descrito varias realizaciones de bibliotecas de scFv presentadas en proteínas de recubrimiento de bacteriófagos. Se conocen también refinamientos de estrategias de presentación de fagos, por ejemplo como se describe en los documentos WO96/06213 y
40 WO92/01047 (Medical Research Council *et al.*) y WO97/08320 (Morphosys), que se incorporan en la presente memoria como referencia.

Otros sistemas para generar bibliotecas de polipéptidos implican el uso de maquinaria enzimática sin células para la síntesis *in vitro* de los miembros de biblioteca. En un método, se seleccionan moléculas de ARN mediante tandas alternas de selección frente a un ligando diana y amplificación de PCR (Tuerk y Gold (1990) *Science*, 249: 505; Ellington y Szostak (1990) *Nature*, 346: 818). Puede usarse una técnica similar para identificar secuencias de ADN que se unen a un factor de transcripción humana predeterminado (Thiesen y Bach (1990) *Nucleic Acid Res.*, 18: 3203; Beaudry y Joyce (1992) *Science*, 257: 635; documentos WO92/05258 y WO92/14843). De una forma similar, la traducción *in vitro* puede usarse para sintetizar polipéptidos como un método para generar grandes bibliotecas. Estos métodos que en general comprenden complejos de polisomas estabilizados, se describen además en los
50 documentos WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058 y WO92/02536. Los sistemas de presentación alternativos que no se basan en fagos como los descritos en los documentos WO95/22625 y WO95/11922 (Affymax) usan los polisomas para presentar los polipéptidos para la selección.

Una categoría adicional más de técnicas implica la selección de repertorios en compartimentos artificiales, que permiten la unión de un gen con su producto génico. Por ejemplo, se describe un sistema de selección en el que los
55 ácidos nucleicos que codifican productos génicos deseados pueden seleccionarse en microcápsulas formadas por emulsiones de agua en aceite en los documentos WO99/02671, WO00/40712 y Tawfik & Griffiths (1998) *Nature Biotechnol* 16(7), 652-6. Los elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad deseada están compartimentalizados en microcápsulas y después se transcriben y/o se traducen para producir sus productos génicos respectivos (ARN o proteína) en las microcápsulas. Los elementos genéticos que producen un producto
60 génico que tiene actividad deseada posteriormente se clasifican. Esta estrategia selecciona productos génicos de interés detectando la actividad deseada mediante diversos medios.

B. Construcción de bibliotecas.

Las bibliotecas destinadas a la selección pueden construirse usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo como se indica anteriormente, o pueden adquirirse de fuentes comerciales. Las bibliotecas que son útiles en la presente invención se describen, por ejemplo, en el documento WO99/20749. Una vez que se elige un sistema de 5 vectores y que se clona una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de interés en el vector de bibliotecas, se puede generar diversidad dentro de las moléculas clonadas realizando mutagénesis antes de la expresión; alternativamente, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse, como se describió anteriormente, antes de la mutagénesis y se realizan tandas adicionales de selección. La mutagénesis de 10 secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos optimizados estructuralmente se realiza mediante métodos moleculares estándar. Es de uso particular la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, (Mullis y Faloona (1987) *Methods Enzymol.*, 155: 335, incorporado en la presente memoria como referencia). La PCR, que emplea múltiples ciclos de replicación de ADN catalizada por una ADN polimerasa dependiente de ADN 15 termoestable para amplificar la secuencia diana de interés, es bien conocida en la técnica. La construcción de diversas bibliotecas de anticuerpos se ha abordado en Winter *et al.* (1994) *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55, y en las referencias citadas en este documento.

La PCR se realiza usando ADN de molde (al menos 1fg; más comúnmente, 1-1.000 ng) y al menos 25 pmol de cebadores de oligonucleótidos; puede ser ventajoso usar una gran cantidad de cebador cuando la reserva de 20 cebadores es muy heterogénea, ya que cada secuencia está representada por solo una pequeña fracción de las moléculas de la reserva, y las cantidades se vuelven limitativas en los ciclos posteriores de amplificación. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 μ l de DNA, 25 pmol de oligonucleótido primer, 2,5 μ l de tampón PCR 10X 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4 ml de dNTP 1,25 μ M, 0,15 μ l (o 2,5 unidades) de ADN polimerasa Taq (Perkin 25 Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada a un volumen total de 25 μ l. Se extiende aceite mineral y la PCR se realiza usando un ciclador térmico programable. La longitud y la temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajustan de acuerdo con los requisitos de severidad en la práctica. La temperatura de 25 reasociación y el tiempo se determinan mediante la eficiencia con la que se espera que un cebador se reasocie en un molde y el grado de ausencia de emparejamiento que se tolerará; obviamente, cuando las moléculas de ácidos nucleicos se someten simultáneamente a amplificación y mutagénesis, se requiere ausencia de emparejamiento, al menos en la primera tanda de síntesis. La capacidad de optimizar la severidad de las condiciones de reasociación del cebador se encuentra dentro del conocimiento de un experto en la técnica medio. Se emplea una temperatura de 30 reasociación de entre 30 °C y 72 °C. La desnaturalización inicial de las moléculas del molde tiene lugar normalmente a entre 92 °C y 99 °C durante 4 minutos, seguido por 20-40 ciclos que consisten en desnaturalización (94-99 °C durante 15 segundos a 1 minuto), reasociación (temperatura determinada según se ha expuesto anteriormente; 1-2 minutos) y extensión (72 °C durante 1-5 minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado). La extensión final es en general de 4 minutos a 72 °C, y puede seguirse de una etapa indefinida (0-24 horas) a 4 °C.

35 C. Combinación de dominios variables individuales

Los dominios útiles en la invención, una vez seleccionados, pueden combinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen métodos covalentes y no covalentes.

Los métodos preferidos incluyen uso de grupos enlazadores polipeptídicos, como se describe, por ejemplo, en relación con las moléculas scFv (Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426). Se proporciona una exposición de los 40 grupos enlazadores adecuados en Bird *et al.* *Science* 242, 423-426; Hudson *et al.*, *Journal Immunol. Methods* 231 (1999) 177-189; Hudson *et al.*, *Proc Nat Acad Sci USA* 85, 5879-5883. Los grupos enlazadores son preferiblemente flexibles, lo que permite la interacción de los dos dominios individuales. Un ejemplo de grupo enlazador es un grupo enlazador (Gly₄Ser)_n, en el que n = 1 a 8, p. ej., 2, 3, 4, 5 o 7. También pueden emplearse grupos enlazadores usados en diacuerpos, que son menos flexibles (Holliger *et al.*, (1993) *PNAS (USA)* 90:6444-6448).

45 En una realización, el grupo enlazador empleado no es una región bisagra de inmunoglobulinas.

Los dominios variables pueden combinarse usando métodos distintos de los grupos enlazadores. Por ejemplo, el uso de puentes de disulfuro, proporcionados a través de residuos de cisteína de ocurrencia natural o diseñados, puede aprovecharse para estabilizar dímeros V_H-V_H, V_L-V_L o V_H-V_L (Reiter *et al.*, (1994) *Protein Eng.* 7:697-704) o por remodelación de la interfaz entre los dominios variables para mejorar el "ajuste" y así la estabilidad de la 50 interacción (Ridgeway *et al.*, (1996) *Protein Eng.* 7:617-621; Zhu *et al.*, (1997) *Protein Science* 6:781-788).

Pueden emplearse otras técnicas para unir o estabilizar dominios variables de inmunoglobulinas, y en particular dominios de anticuerpos V_H, según resulte apropiado.

Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria pueden estar en conformaciones "cerradas" en solución. Una conformación "cerrada" es aquella en la que los dos dominios (por ejemplo, V_H y V_L) están presentes 55 en forma asociada, como por ejemplo un par V_H-V_L asociado que forma un sitio de unión a anticuerpos. Por ejemplo, scFv puede estar en una conformación cerrada, dependiendo de la disposición del grupo enlazador usado para vincular los dominios V_H y V_L. Si es suficientemente flexible para permitir la asociación de los dominios, o los mantiene rígidamente en la posición asociada, es probable que los dominios adopten una conformación cerrada.

Análogamente, los pares de dominios V_H y los pares de dominios V_L pueden existir en una conformación cerrada. En general, esto dependerá de la estrecha asociación de los dominios, por ejemplo mediante un grupo enlazador rígido, en la molécula del ligando. Los ligandos en una conformación cerrada no podrán unirse a la molécula que aumenta la semivida del ligando y a una segunda molécula diana. Así, el ligando se unirá solo normalmente a la segunda molécula diana en disociación de la molécula que aumenta la semivida del ligando.

Por otra parte, la construcción de dímeros V_H/V_H , V_L/V_L o V_H/V_L sin grupos enlazadores proporciona competencia entre los dominios.

- Por otra parte los ligandos pueden estar en una conformación abierta. En dicha conformación, los ligandos podrán unirse simultáneamente a la molécula que aumenta la semivida del ligando y a la segunda molécula diana.
- 10 Normalmente, los dominios variables en una configuración abierta se encuentran (en el caso de pares V_H-V_L) suficientemente alejados de los dominios que no interaccionan y forman un sitio de unión a anticuerpos y no para competir por la unión a sus epítomos respectivos. En el caso de dímeros V_H/V_H o V_L/V_L , los dominios no se ven forzados a estar unidos por grupos enlazadores rígidos. Naturalmente, dichos emparejamientos de dominios no competirán por la unión a antígeno ni formarán un sitio de unión a anticuerpos.
- 15 Los fragmentos Fab y los anticuerpos enteros existirán principalmente en la conformación cerrada, aunque se observará que es probable la existencia de ligandos específicos dobles abiertos y cerrados en diversos equilibrios en diferentes circunstancias. La unión del ligando a una diana desplazará probablemente el balance del equilibrio hacia la configuración abierta. Así, algunos ligandos según la invención pueden existir en dos conformaciones en solución, una de las cuales (la forma abierta) puede unirse a dos antígenos o epítomos independientemente, mientras que la conformación alternativa (la forma cerrada) solo puede unirse a un antígeno o epítomo; los antígenos o epítomos compiten así por la unión al ligando en esta conformación.
- 20

Aunque la forma abierta del ligando específico doble puede así existir en equilibrio con la forma cerrada en solución, se contempla que el equilibrio favorecerá a la forma cerrada; por otra parte, la forma abierta puede ser secuestrada por la unión a la diana en una conformación cerrada. Preferiblemente, por tanto, algunos ligandos específicos dobles están presentes en un equilibrio entre dos conformaciones (abierta y cerrada).

25

Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria pueden modificarse con el fin de favorecer una conformación abierta o cerrada. Por ejemplo, la estabilización de interacciones V_H-V_L con enlaces de disulfuro estabiliza la conformación cerrada. Por otra parte, los grupos enlazadores usados para unirse a los dominios, que incluyen pares de dominio V_H y dominio V_L , pueden construirse de manera que la forma abierta se vea favorecida; por ejemplo, los grupos enlazadores pueden impedir estéricamente la asociación de los dominios, por ejemplo por incorporación de grandes residuos de aminoácidos en lugares oportunos, o el diseño de una estructura rígida adecuada que mantendrá los dominios separados físicamente.

30

D. Caracterización del ligando específico doble.

La unión del ligando específico doble a sus antígenos o epítomos específicos puede comprobarse por métodos que serán familiares para los expertos en la técnica y que incluyen ELISA. En una realización preferida, la unión se somete a ensayo con ELISA de fagos monoclonales.

35

La técnica ELISA de fagos puede realizarse según cualquier procedimiento adecuado: a continuación se explica un protocolo de ejemplo.

Las poblaciones de fago producidos en cada tanda de selección pueden cribarse para unión mediante ELISA al antígeno o epítomo seleccionado, con el fin de identificar anticuerpos de fagos "policlonales". Los fagos de las colonias bacterianas infectadas individuales de estas poblaciones pueden cribarse a continuación mediante ELISA para identificar anticuerpos de fagos "monoclonales". También es conveniente cribar fragmentos de anticuerpos solubles en cuanto a la unión a antígeno o epítomo, lo cual puede realizarse también por ELISA usando reactivos, por ejemplo, frente a una marca en el extremo C o N (véase por ejemplo Winter *et al.* (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55 y las referencias citadas en el mismo).

40

45

La diversidad de los anticuerpos monoclonales de fagos pueden evaluarse también mediante electroforesis en gel de productos de PCR (Marks *et al.* 1991, más arriba; Nissim *et al.* 1994 más arriba), por sondeo (Tomlinson *et al.*, 1992 J. Mol. Biol. 227, 776) o por secuenciación del ADN del vector.

E. Estructura de 'ligandos específicos dobles'.

Como se describió anteriormente, un anticuerpo se define en la presente memoria como un anticuerpo (por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgE) o fragmento (Fab, Fv, Fv con enlace de disulfuro, scFv, diacuerpo) que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada y ligera, al menos dos dominios variables de cadena pesada o al menos dos dominios variables de cadena ligera. Puede obtenerse al menos en parte de cualquier especie que produce naturalmente un anticuerpo, o crearse mediante tecnología de ADN recombinante; ya sea aislado a partir de suero, linfocitos B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias).

50

55

En una realización preferida el ligando específico doble comprende al menos un dominio variable individual de cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable individual de cadena ligera de un anticuerpo, o dos dominios variables individuales de cadena pesada o ligera. Por ejemplo, el ligando puede comprender un par V_H/V_L , un par de dominios V_H o un par de dominios V_L .

- 5 Los dominios variables primero y segundo de dicho ligando pueden estar en la misma cadena de polipéptidos. Alternativamente pueden estar en cadenas de polipéptidos separadas. En el caso de que estén en la misma cadena de polipéptidos pueden estar unidos por un grupo enlazador, que es preferiblemente una secuencia peptídica, como se describió anteriormente.

Los dominios variables primero y segundo pueden estar asociados de forma covalente o no covalente. En caso de
10 que estén asociados de forma covalente, los enlaces covalentes pueden ser enlaces de disulfuro.

En caso de que los dominios variables se seleccionen entre repertorios de genes V seleccionados por ejemplo usando tecnología de presentación de fagos como se describe en la presente memoria, entonces estos dominios variables comprenden una región marco universal, de manera que pueden ser reconocidos por un ligando específico genérico como se define en la presente memoria. El uso de marcos universales, ligandos genéricos y similares se describe en el documento WO99/20749.
15

Cuando se usan repertorios de genes V la variación en la secuencia polipeptídica se sitúa preferiblemente en los lazos estructurales de los dominios variables. Las secuencias polipeptídicas de cada dominio variable pueden modificarse por barajado de ADN o por mutación con el fin de potenciar la interacción de cada dominio variable con su par complementario. El barajado de ADN es conocido en la técnica y se enseña, por ejemplo, en Stemmer, 1994, Nature 370: 389-391 y la patente de EE.UU. nº 6.297.053, que se incorporan en la presente memoria como referencia. Otros métodos de mutagénesis son bien conocidos para los expertos en la técnica.
20

En una realización preferida el 'ligando específico doble' es un fragmento F_v monocatenario. En una realización alternativa, el 'ligando específico doble' consiste en un formato Fab.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un ácido nucleico que codifica al menos un 'ligando
25 específico doble' como se define en la presente memoria.

Un experto en la técnica observará que los dos antígenos o epítomos pueden unirse simultáneamente a la misma molécula de anticuerpos. Alternativamente, pueden competir por la unión a la misma molécula de anticuerpos. Por ejemplo, cuando los dos epítomos están unidos simultáneamente, ambos dominios variables de un ligando específico doble son capaces de unirse independientemente a sus epítomos diana. Cuando los dominios compiten, el dominio
30 variable es capaz de unirse a su diana, pero no al mismo tiempo que el otro dominio variable se une a su diana semejante; o el primer dominio variable es capaz de unirse a su diana, pero no al mismo tiempo que el segundo dominio variable se une a su diana semejante.

Los dominios variables pueden obtenerse de anticuerpos dirigidos frente a antígenos o epítomos diana. Alternativamente pueden obtenerse de un repertorio de dominios de anticuerpos individuales como los expresados
35 en la superficie de bacteriófagos filamentosos. La selección puede realizarse como se describe a continuación.

En general, las moléculas de ácidos nucleicos y las estructuras artificiales de vectores requeridas para la realización de la presente invención pueden construirse y manipularse como se expone en los manuales de laboratorio estándar, como Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, EE.UU.

La manipulación de ácidos nucleicos útiles en la presente invención se realiza normalmente en vectores
40 recombinantes.

Como se emplea en la presente memoria, vector se refiere a un elemento discreto que se emplea para introducir ADN heterólogo en células para la expresión y/o replicación del mismo. Los métodos por los que se seleccionan y construyen y, posteriormente, se usan dichos vectores son bien conocidos para un experto en la técnica. Se dispone públicamente de numerosos vectores, que incluyen plásmidos bacterianos, bacteriófagos, cromosomas artificiales y
45 vectores episomales. Dichos vectores pueden usarse para clonación y mutagénesis simple; alternativamente se emplea un vector de expresión génica. Puede seleccionarse un vector de uso según la invención para dar cabida a una secuencia de codificación de polipéptidos de un tamaño deseado, normalmente de 0,25 kilobases (kb) a 40 kb o más de longitud. Una célula hospedadora adecuada se transforma con el vector después de manipulaciones de clonación *in vitro*. Cada vector contiene varios componentes funcionales, que en general incluyen un sitio de clonación (o "poligrupo enlazador"), un origen de replicación y al menos un gen marcador seleccionable. Si un vector
50 dado es un vector de expresión, posee adicionalmente uno o más de los siguientes: elemento potenciador, promotor, secuencias de señal y terminación de transcripción, cada uno situado en las proximidades del sitio de clonación, de manera que están unidos operativamente al gen que codifica un ligando según la invención.

Los vectores de clonación y expresión contienen en general secuencias de ácidos nucleicos que permiten que el
55 vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Normalmente en los vectores de clonación, esta secuencia es tal que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del

hospedador e incluye orígenes de replicación o secuencias replicantes de forma autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen de plásmido de 2 micrómetros es adecuado para las levaduras, y diversos orígenes víricos (p. ej. SV 40, adenovirus) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos salvo que se usen en células de mamífero capaces de replicar altos niveles de ADN, como las células COS.

Ventajosamente, un vector de clonación o expresión puede contener un gen de selección referido también como marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células hospedadoras transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán por tanto en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a los antibióticos y otras toxinas, p. ej. ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan las deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos no disponibles en los medios de crecimiento.

Dado que la replicación de vectores que codifican un ligando según la presente invención se realiza de la forma más conveniente y *E. coli*, se emplea un marcador seleccionable de *E. coli*, por ejemplo, el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Estos elementos pueden obtenerse de plásmidos de *E. coli*, como pBR322 o un plásmido de pUC como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión contienen normalmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y que se une operativamente con la secuencia codificante de interés. Dicho promotor puede ser inducible o constitutivo. La expresión "unida operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la forma pretendida. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen, por ejemplo, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (*trp*) y los promotores híbridos como el promotor *tac*. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán en general una secuencia de Shine-Delgarno unida operativamente a la secuencia codificante.

Los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos correspondiente a un miembro de biblioteca de polipéptidos. Así, la selección con el antígeno o epítipo primero y/o segundo puede realizarse mediante propagación y expresión separadas de un solo clon que expresa el miembro de biblioteca de polipéptidos o mediante el uso de cualquier sistema de presentación de selección. Como se describió anteriormente, el sistema de presentación de selección preferido es la presentación de bacteriófagos. Así, pueden usarse vectores de fagos o fagémidos, p. ej. pIT1 o pIT2. Las secuencias delanteras útiles en la invención incluyen *pelB*, *still*, *ompA*, *phoA*, *bla* y *pelA*. Un ejemplo son vectores de fagémidos que tienen un origen de replicación de *E. coli* (para replicación bicatenaria) y también un origen de replicación de fagos (para la producción de ADN monocatenario). La manipulación y la expresión de dichos vectores es bien conocida en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) más arriba; Nissim *et al.* (1994) más arriba). Brevemente, el vector contiene un gen de β -lactamasa para conferir selectividad en el fagémido y un promotor *lac* en dirección 5' de una casete de expresión que consiste en (en terminal N a C) una secuencia delantera *pelB* (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplásmico), un sitio de clonación múltiple (para clonación de la versión del nucleótido del miembro de la biblioteca), opcionalmente, una o más etiquetas de péptidos (para detección), opcionalmente, uno o más codones de detención TAG y la proteína de fagos pIII. Así, usando varias cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, iso-propiltio- β -D-galactósido (IPTG) o un fago auxiliar, como VCS M13, el vector es capaz de replicarse como un plásmido sin expresión, de producir grandes cantidades del miembro de biblioteca de polipéptidos solo o de producir fagos, algunos de los cuales contienen al menos una copia de la fusión de polipéptido pIII en su superficie.

La construcción de vectores que codifican ligandos según la invención emplea técnicas de unión convencional. Los vectores aislados o los fragmentos de ADN se escinden, se adaptan y se vuelven a unir en la forma deseada para generar el vector requerido. Si se desea, el análisis para confirmar que están presentes las secuencias correctas en el vector construido puede realizarse de una forma conocida. Los métodos adecuados para construir vectores de expresión, preparando transcripciones *in vitro*, introduciendo ADN en células hospedadoras y realizando análisis para evaluar la expresión y la función son conocidos para los expertos en la técnica. La presencia de una secuencia génica en una muestra se detecta, o se cuantifica su amplificación y/o expresión por métodos convencionales, como análisis Southern o Northern, transferencia Western, hibridación puntual de ADN, ARN o proteínas, hibridación *in situ*, inmunocitoquímica o análisis de secuencias de ácidos nucleicos o moléculas de proteínas. Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente cómo modificar estos métodos, si lo desean.

Estructura de ligandos multiespecíficos de conformación cerrada

Según un aspecto de la segunda configuración de la presente descripción, los dos o más dominios no complementarios de unión a epítopos están unidos de manera que están en una conformación cerrada como se define en la presente memoria. Ventajosamente, pueden unirse además a un esqueleto que puede, como

alternativa, o además de un grupo enlazador descrito en la presente memoria, facilitar la formación y/o mantenimiento de la conformación cerrada de los sitios de unión a epítomos entre sí.

(I) Esqueletos

Los esqueletos puede basarse en moléculas de inmunoglobulinas o puede tener un origen de no inmunoglobulinas como se indica anteriormente. Los esqueletos de inmunoglobulinas preferidos como se define en la presente memoria incluyen uno cualquiera o más de los seleccionados entre los siguientes: una molécula de inmunoglobulinas que comprende al menos (i) el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo; o (ii) el dominio CH1 de una cadena pesada de anticuerpos; una molécula de inmunoglobulinas que comprende los dominios CH1, CH2 y CH3 de una cadena pesada de anticuerpos; o cualquiera del subconjunto (ii) en conjunción con el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo. Puede incluirse también un dominio de región bisagra. Dichas combinaciones de dominios pueden emular, por ejemplo, a anticuerpos naturales, como IgG o IgM, o a fragmentos de los mismos, como moléculas Fv, scFv, Fab o F(ab')₂. Los expertos en la técnica comprenderán que esta lista no pretende ser exhaustiva.

15 (II) Armazones de proteínas

Cada dominio de unión a epítomos comprende un armazón de proteínas y una o más CDR que intervienen en la interacción del dominio específica con uno o más epítomos. Ventajosamente, un dominio de unión a epítomos según la presente invención comprende tres CDR. Los armazones de proteínas adecuados incluyen cualquiera de los seleccionados entre el grupo que consiste en los siguientes: los basados en dominios de inmunoglobulinas, los basados en fibronectina, los basados en moléculas affibody, los basados en CTLA4, los basados en chaperonas como GroEL, los basados en lipocalina y los basados en los receptores Fc bacterianos SpA y SpD. Los expertos en la técnica observarán que esta lista no pretende ser exhaustiva.

F: Armazones para su uso en la construcción de ligandos específicos dobles

i. Selección de la conformación de cadena principal

25 Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas comparten todos los plegamientos similares para sus cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, aunque los anticuerpos son muy diversos en términos de su secuencia primaria, la comparación de secuencias y estructuras cristalográficas ha revelado que, al contrario de lo esperado, cinco de los seis lazos de unión a antígeno de anticuerpos (H1, H2, L1, L2, L3) adoptan un número limitado de conformaciones de cadena principal, o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901; Chothia *et al.* (1989) *Nature*, 342: 877). El análisis de las longitudes de lazo y los residuos clave ha permitido por tanto predecir las conformaciones de cadena principal de H1, H2, L1, L2 y L3 presentes en la mayoría de los anticuerpos humanos (Chothia *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinson *et al.* (1995) *EMBO J.*, 14: 4628; Williams *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en términos de secuencia, longitud y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de cadena principal para longitudes de lazo cortas que dependen de la longitud y la presencia de residuos particulares, o tipos de residuo, en posiciones clave en el lazo y la estructura principal del anticuerpo (Martin *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai *et al.* (1996) *FEBS Letters*, 399: 1).

Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria se ensamblan ventajosamente a partir de bibliotecas de dominios, como bibliotecas de dominios V_H y/o bibliotecas de dominios V_L. Por otra parte, los ligandos específicos dobles pueden proporcionarse de por sí en forma de bibliotecas. En un aspecto, se diseñan las bibliotecas de ligandos específicos dobles y/o dominios en los que se han elegido determinadas longitudes de lazo y residuos clave para garantizar que se conoce la conformación de cadena principal de los miembros. Ventajosamente, son conformaciones reales de moléculas de la superfamilia de la inmunoglobulina presentes en la naturaleza, para reducir al mínimo las probabilidades de que sean no funcionales, como se expone anteriormente. Los segmentos V de líneas germinales actúan como un marco básico adecuado para construir bibliotecas de anticuerpos o receptores de linfocitos T; también se usan otras secuencias. Pueden producirse variaciones a frecuencia muy baja, de manera que un pequeño número de miembros funcionales puede poseer una confirmación de cadena principal alterada, que no afecta a su función.

La teoría de estructuras canónicas se emplea también para evaluar el número de diferentes conformaciones de cadena principal codificadas por ligandos, para predecir la conformación de cadena principal basada en secuencias de ligandos y para elegir residuos para diversificación que no afectan a la estructura canónica. Se conoce que, en el dominio V_k humano, el lazo L1 puede adoptar una de cuatro estructuras canónicas, el L2 lazo tiene una única estructura canónica y el 90 % de los dominios V_k humanos adoptan una de cuatro o cinco estructuras canónicas para el lazo L3 (Tomlinson *et al.* (1995) más arriba); así, en el dominio V_k en solitario, pueden combinarse diferentes estructuras canónicas para crear un intervalo de diferentes conformaciones de cadena principal. Dado que el dominio V_k codifica un intervalo diferente de estructuras canónicas para los lazos L1, L2 y L3 y que los dominios V_k y V_λ pueden emparejarse con cualquier dominio V_H que puede codificar varias estructuras canónicas para los lazos H1 y H2, el número de combinaciones de estructuras canónicas observadas para estos cinco lazos es muy amplio. Esto

implica que la generación de diversidad en la conformación de la cadena principal puede ser esencial para la producción de un amplio intervalo de especificidades de unión. Sin embargo, al construir una biblioteca de anticuerpos basada en una única conformación de cadena principal conocida se ha encontrado, al contrario de lo esperado, que la diversidad en la conformación de cadena principal no es necesaria para generar suficiente
5 diversidad para dirigirse sustancialmente a todos los antígenos. De forma incluso más sorprendente, la única conformación de cadena principal no tiene que ser una estructura de consenso; puede usarse una única conformación de ocurrencia natural como base para toda la biblioteca. Así, en un aspecto preferido, los ligandos específicos dobles poseen una única conformación de cadena principal conocida.

La única conformación de cadena principal que se elige es preferiblemente común entre las moléculas del tipo de
10 superfamilia de inmunoglobulinas en cuestión. Una conformación es común cuando se observa que la adopta un número importante de moléculas de ocurrencia natural. Por consiguiente, en un aspecto preferido, la ocurrencia natural de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada lazo de unión de un dominio de inmunoglobulinas se considera por separado, y a continuación se elige un dominio variable de ocurrencia natural que posea la combinación de conformaciones de cadena principal deseadas para los diferentes lazos. Si no hay
15 ninguna disponible, puede elegirse la más próxima equivalente. Es preferible que la combinación de conformaciones de cadena principal deseada para los diferentes lazos se cree seleccionando segmentos génicos de línea germinal que codifican las conformaciones de cadena principal deseadas. Es más preferible que los segmentos génicos de línea germinal seleccionados se expresen frecuentemente en la naturaleza, y lo más preferible es que se expresen con la máxima frecuencia de todos los segmentos génicos de línea germinal naturales.

20 En el diseño de ligandos específicos dobles o bibliotecas de los mismos la incidencia de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada uno de los seis lazos de unión a antígeno puede considerarse por separado. Para H1, H2, L1, L2 y L3, se elige una conformación dada que sea adoptada por entre el 20 % y el 100 % de los lazos de unión a antígeno de las moléculas de ocurrencia natural. Normalmente, su incidencia observada es superior al 35 % (es decir entre el 35 % y el 100 %) e, idealmente, superior al 50 % o incluso superior al 65 %. Dado
25 que la inmensa mayoría de los lazos H3 no tienen estructuras canónicas, es preferible seleccionar una conformación de cadena principal que sea común entre esos lazos que presentan estructuras canónicas. Para cada uno de los lazos, se selecciona por tanto la conformación que se observa con la mayor frecuencia en el repertorio natural. En los anticuerpos humanos, las estructuras canónicas más populares (CS) para cada lazo son las siguientes: H1 - CS 1 (79 % del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46 %), L1 - CS 2 de V_{κ} (39 %), L2 - CS 1 (100 %), L3 - CS 1 de V_{κ} (36 %)
30 (el cálculo supone una proporción $\kappa:\lambda$ de 70:30, Hood *et al.* (1967) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 48: 133). Para lazos H3 que tienen estructuras canónicas, la más común parece ser la longitud CDR3 (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, U.S. Department of Health and Human Services) de siete residuos con un puente salino del residuo 94 al residuo 101. Existen al menos 16 secuencias de anticuerpos humanos en la biblioteca de datos de EMBL con la longitud H3 requerida y residuos clave para formar esta
35 conformación y al menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteínas que puede usarse como base para la modelización de anticuerpos (2cgr y 1tet). Los segmentos génicos de línea germinal expresados más frecuentemente de esta combinación de estructuras canónicas son el segmento V_H 3-23 (DP-47), el segmento J_H JH4b, el segmento V_{κ} O2/O12 (DPK9) y el segmento J_{κ} $J_{\kappa}1$. Los segmentos V_H DP45 y DP38 son también adecuados. Estos segmentos pueden usarse por tanto en combinación como base para construir una biblioteca con
40 la conformación de cadena principal individual deseada.

Alternativamente, en lugar de elegir la conformación de cadena principal individual basándose en la ocurrencia natural de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada uno de los lazos de unión de forma aislada, la ocurrencia natural de combinaciones de conformaciones de cadena principal se emplea como base para elegir la conformación de cadena principal individual. En el caso de anticuerpos, por ejemplo, puede determinarse la
45 ocurrencia natural de combinaciones de estructuras canónicas para dos, tres, cuatro, cinco o para los seis lazos de unión a antígeno. En este caso, es preferible que la conformación elegida sea común en los anticuerpos de ocurrencia natural y lo más preferible es que se observe con la máxima frecuencia en el repertorio natural. Así, en anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando se consideran combinaciones naturales de los cinco lazos de unión a antígeno, H1, H2, L1, L2 y L3, se determina la combinación de estructuras canónicas más frecuente y a continuación
50 se combina con la conformación más popular para el lazo H3, como base para elegir la conformación de cadena principal individual.

ii. Diversificación de la secuencia canónica

Una vez seleccionadas varias conformaciones de cadena principal conocidas o, preferiblemente una única conformación de cadena principal conocida, los ligandos específicos dobles o bibliotecas para su uso en la invención
55 pueden construirse modificando el sitio de unión de la molécula con el fin de generar un repertorio con diversidad estructural y/o funcional. Esto significa que se generan variantes de manera que poseen suficiente diversidad en su estructura y/o en su función de modo que sean capaces de proporcionar un intervalo de actividades.

La diversidad deseada se genera normalmente variando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones que se cambiarán pueden elegirse al azar o preferiblemente se seleccionan. La variación puede
60 conseguirse a continuación mediante aleatorización, durante la cual el aminoácido residente es sustituido por cualquier aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, que produce un número muy grande de variantes o

sustituyendo el aminoácido residente por uno o más de un subconjunto definido de aminoácidos, para producir un número más limitado de variantes.

Se han comunicado varios métodos para introducir dicha diversidad. Puede usarse PCR proclive a errores (Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.*, 226: 889), mutagénesis química (Deng *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.*, 269: 9533) o cepas mutadoras bacterianas (Low *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 260: 359) para introducir mutaciones aleatorias en los genes que codifican la molécula. En la técnica se conocen también métodos para mutar posiciones seleccionadas e incluyen el uso de ausencia de oligonucleótidos emparejados u oligonucleótidos degenerados, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, se han creado varias bibliotecas de anticuerpos sintéticos direccionando mutaciones a los lazos de unión a antígeno. La región H3 de una FAB de unión a toxoides del tétanos humano se ha aleatorizado para crear un intervalo de nuevas especificidades de unión (Barbas *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457). Las regiones H3 y L3 aleatorias o semialeatorias se han añadido a los segmentos génicos V de líneas germinales para producir grandes bibliotecas con regiones marco no mutadas (Hoogenboom & Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457; Nissim *et al.* (1994) *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths *et al.* (1994) *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruif *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.*, 248: 97). Esta diversificación se ha extendido para incluir parte o la totalidad de los otros lazos de unión a antígeno (Cramer *et al.* (1996) *Nature Med.*, 2: 100; Riechmann *et al.* (1995) *Bio/Technology* 13: 475; Morphosys, documento WO97/08320, más arriba).

Dado que la aleatorización de los lazos tiene el potencial de crear aproximadamente más de 10^{15} estructuras para H3 en solitario y un número análogamente grande de variantes para los otros cinco lazos, no es viable usar tecnología de transformación actual o incluso sistemas sin células para producir una biblioteca que representa todas las combinaciones posibles. Por ejemplo, en una de las mayores bibliotecas construidas hasta la fecha, se generaron 6×10^{10} anticuerpos diferentes, que es solo una fracción de la diversidad potencial para una biblioteca de este diseño (Griffiths *et al.* (1994) más arriba).

En una realización preferida, los únicos residuos que intervienen directamente en la creación o la modificación de la función deseada de la molécula están diversificados. Para muchas moléculas, la función se unirá a la diana y por tanto la diversidad debe concentrarse en el sitio de unión a diana, mientras se evita cambiar los residuos que son cruciales para el empaquetamiento general de la molécula o para mantener la conformación de cadena principal elegida.

Diversificación de la secuencia canónica en su aplicación a los dominios de anticuerpos

En el caso de ligandos específicos dobles de anticuerpos, el sitio de unión para la diana es con la máxima frecuencia el sitio de unión a antígeno. Así, en un aspecto altamente preferido, la descripción proporciona bibliotecas de o para el ensamblaje de ligandos específicos dobles de anticuerpos en los que los únicos residuos en el sitio de unión a antígeno varían. Estos residuos son extremadamente diversos en el repertorio de anticuerpos humanos y se sabe que forman contactos en complejos de anticuerpo/antígeno de alta resolución. Por ejemplo, en L2 se conoce que las posiciones 50 y 53 son diversas en anticuerpos de ocurrencia natural y se observa que forman contacto con el antígeno. En cambio, el enfoque convencional consistiría en diversificar todos los residuos en la región de determinación de complementariedad (CDR1) correspondiente como definen Kabat *et al.* (1991, más arriba), unos siete residuos comparados con los dos diversificados en la biblioteca para su uso como se describe en la presente memoria. Esto representa una importante mejora en términos de la diversidad funcional requerida para crear un intervalo de especificidades de unión a antígenos.

En la naturaleza, la diversidad de anticuerpos es el resultado de dos procesos: recombinación somática de segmentos génicos V, D y J de línea germinal para crear un nuevo repertorio primario (la denominada diversidad de línea germinal y de unión) e hipermutación somática de los genes V reordenados resultantes. El análisis de secuencias de anticuerpos humanos ha mostrado que la diversidad en el repertorio primario se enfoca en el centro del sitio de unión a antígeno mientras que la hipermutación somática extiende la diversidad a regiones en la periferia del sitio de unión a antígeno que están altamente conservadas en el repertorio primario (véase Tomlinson *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.*, 256: 813). Esta complementariedad ha evolucionado probablemente como una estrategia eficaz para la búsqueda del espacio de secuencia y, aunque aparentemente única para los anticuerpos, puede aplicarse fácilmente a otros repertorios de polipéptido. Los residuos que se varían constituyen un subconjunto de los que forman el sitio de unión para la diana. Diferentes subconjuntos (que incluyen superposición) de residuos en el sitio de unión diana están diversificados en diferentes fases durante la selección, si se desea.

En el caso de un repertorio de anticuerpos, se crea un repertorio 'nuevo' inicial en el que algunos, pero no todos, de los residuos en el sitio de unión a antígeno están diversificados. Como se emplea en la presente memoria en este contexto, el término "nuevo" se refiere a moléculas de anticuerpos que no tienen diana predeterminada. Estas moléculas se asemejan a las codificadas por los genes de inmunoglobulinas de una persona que no se ha sometido a diversificación inmunitaria, como es el caso de los fetos y los recién nacidos, cuyos sistemas inmunitarios no se han visto enfrentados todavía a una amplia variedad de estímulos antígenicos. A continuación se selecciona este repertorio frente a un intervalo de antígenos o epítopos. Si se necesita, puede introducirse mayor diversidad fuera de la región diversificada en el repertorio inicial. Este repertorio maduro puede seleccionarse para una función, especificidad o afinidad modificada.

La descripción en la presente memoria proporciona dos repertorios de dominios de unión nuevos diferentes para la construcción de ligandos específicos dobles, o una nueva biblioteca de ligandos específicos dobles, en los que parte o la totalidad de los residuos en el sitio de unión a antígeno son variados. La biblioteca "primaria" imita al repertorio primario natural, con diversidad limitada a los residuos en el centro del sitio de unión a antígeno que son diversos en los segmentos génicos V de la línea germinal (diversidad de línea germinal) o están diversificados durante el proceso de recombinación (diversidad de unión). Los residuos que están diversificados incluyen, pero preferiblemente no se limitan a, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96. En la biblioteca "somática", la diversidad se limita a los residuos que se diversifican durante el proceso de recombinación (diversidad de unión) o son tales que somáticamente están muy mutados). Los residuos que se diversifican incluyen, pero preferiblemente no se limitan a: H31, H33, H35, H95, H96, H97, H98, L30, L31, L32, L34 y L96. Para todos los residuos enumerados como adecuados para la diversificación en estas bibliotecas se conoce que forman contacto con uno o más complejos anticuerpo-antígeno. Dado que en las dos bibliotecas no todos los residuos en el sitio de unión a antígeno son variados, se incorpora diversidad adicional durante la selección modificando los residuos restantes, si se desea hacerlo. Para un experto en la técnica será evidente que puede usarse cualquier subconjunto de cualquiera de estos residuos (o residuos adicionales que comprenden el sitio de unión a antígeno) para la diversificación inicial y/o posterior diversificación del sitio de unión a antígeno.

En la construcción de bibliotecas para su uso descrito en la presente memoria, la diversificación de posiciones elegidas se consigue normalmente en el nivel de los ácidos nucleicos, alterando la secuencia codificante que especifica la secuencia del polipéptido de manera que puede incorporarse una serie de posibles aminoácidos (los 20 o un subconjunto de los mismos) en esa posición. Usando la nomenclatura de la IUPAC, el codón más versátil es NNK, que codifica todos los aminoácidos así como el codón de detención MARCA. El codón NNK se emplea preferiblemente para introducir la diversidad requerida. Se usan también otros codones que consiguen los mismos fines, que incluyen el codón NNN, que lleva a la producción de los codones de detención adicionales TGA y TAA.

Una característica de la diversidad de cadena lateral en el sitio de unión a antígeno de anticuerpos humanos es un sesgo pronunciado y favorable a ciertos residuos de aminoácidos. Si se suma la composición de aminoácidos de las diez posiciones más diversas en cada una de las regiones V_H , V_K y V_L , más del 76 % de la diversidad de cadenas laterales procede de solo siete residuos diferentes, que son, serina (24 %), tirosina (14 %), asparagina (11 %), glicina (9 %), alanina (7 %), aspartato (6 %) y treonina (6 %). Este sesgo hacia residuos hidrófilos y residuos pequeños que pueden proporcionar flexibilidad de la cadena principal refleja probablemente la evolución de superficies que están predispuestas a la unión a un amplio intervalo de antígenos o epítomos y puede ayudar a explicar la promiscuidad requerida de anticuerpos en el repertorio primario.

Como es preferible imitar esta distribución de aminoácidos, la distribución de aminoácidos en las posiciones que se variarán imita preferiblemente la observada en el sitio de unión a antígeno de anticuerpos. Este sesgo en la sustitución de aminoácidos que permite la selección de ciertos polipéptidos (no solo los polipéptidos de anticuerpos) frente a un intervalo de antígenos diana se aplica fácilmente a cualquier repertorio de polipéptidos. Existen varios métodos para sesgar la distribución de aminoácidos en la posición que se variará (que incluye el uso de mutagénesis de trinucleótidos, véase el documento WO97/08320), de los que el método preferido, debido a la facilidad de la síntesis, es el uso de codones degenerados convencionales. Comparando el perfil de aminoácidos codificado por todas las combinaciones de codones degenerados (con degeneración única, doble, triple y cuádruple en proporciones iguales en cada posición) con el uso de aminoácidos naturales es posible calcular el codón más representativo. Los codones (AGT)(AGC)T, (AGT)(AGC)C y (AGT)(AGC)(CT). es decir, DVT, DVC y DVY, usando la nomenclatura IUPAC, son los más cercanos al perfil de aminoácidos deseado: codifican el 22 % de serina y el 11 % de tirosina, asparagina, glicina, alanina, aspartato, treonina y cisteína. Preferiblemente, por tanto, las bibliotecas se construyen usando el codón DVT, DVC o DVY en cada una de las posiciones diversificadas.

45 G: Antígenos capaces de aumentar la semivida de los ligandos

Los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria, en una configuración de los mismos, son capaces de unirse a una o más moléculas que pueden aumentar la semivida del ligando *in vivo*. Normalmente, dichas moléculas son polipéptidos que aparecen naturalmente *in vivo* y que se resisten a la degradación o eliminación por mecanismos endógenos que eliminan el material no deseado del organismo. Por ejemplo, la molécula que aumenta la semivida del organismo puede seleccionarse entre las siguientes:

Proteínas de la matriz extracelular; por ejemplo colágeno, lamininas, integrinas y fibronectina. Los colágenos son las principales proteínas de la matriz extracelular. En la actualidad se conocen aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágeno, presentes en diferentes partes del cuerpo, p. ej. colágeno tipo I (que supone el 90 % del colágeno del organismo) presente en el hueso, la piel, el tendón, los ligamentos, la córnea, los órganos internos o el colágeno tipo II presente en el cartilago, el disco intervertebral, el notocordio, el humor vítreo del ojo.

Proteínas presentes en la sangre, que incluyen: proteínas plasmáticas como fibrina, macroglobulina α -2, albúmina sérica, fibrinógeno A, fibrinógeno B, proteína amiloide sérica A, heptaglobina, profilina, ubicuitina, uteroglobulina y β -2-microglobulina;

Enzimas e inhibidores como plasminógeno, lisozima, cistatina C, alfa-1-antitripsina e inhibidor de tripsina

pancreática. El plasminógeno es el precursor inactivo de la serina proteasa plasmina semejante a tripsina. Normalmente se encuentra en circulación por el torrente sanguíneo. Cuando se activa el plasminógeno y se convierte en plasmina, despliega un potente dominio enzimático que disuelve las fibras de fibrinógeno que enmarañan los glóbulos sanguíneos en un coágulo. Este fenómeno se llama fibrinólisis.

5 Proteínas del sistema inmunitario, como IgE, IgG, IgM.

Proteínas de transporte como proteína de unión a retinol, microglobulina α -1.

Defensinas como beta-defensina 1, defensinas de neutrófilos 1, 2 y 3.

Proteínas presentes en la barrera hematoencefálica o en tejidos nerviosos, como el receptor de la melanocortina, la mielina, el transportador de ascorbato.

10 Proteínas de fusión de agente farmacéutico-ligando específico del receptor de transferrina (véase documento US5977307); receptor de células endoteliales de capilares encefálicos, transferrina, receptor de transferrina, insulina, receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF 1), receptor de factor de crecimiento semejante a la insulina 2 (IGF 2), receptor de la insulina.

Proteínas localizadas en el riñón, como policistina, colágeno tipo IV, transportador de aniones orgánicos K1, 15 antígeno de Heymann.

Proteínas localizadas en el hígado, por ejemplo alcohol deshidrogenasa, G250.

Factor de coagulación sanguínea X

Antitripsina α 1

HNF 1 α

20 Proteínas localizadas en el pulmón, como componente secretor (se une a IgA).

Proteínas localizadas en el corazón, por ejemplo HSP 27. Se asocia con la miocardiopatía dilatada.

Proteínas localizadas en la piel, por ejemplo queratina.

Proteínas específicas del hueso, como las proteínas morfogénicas óseas (BMP), que son un subconjunto de la superfamilia del factor de crecimiento de transformación β que muestra actividad osteogénica. Los ejemplos incluyen 25 BMP-2, -4, -5, -6, -7 (también referida como proteína osteogénica (OP-1) y -8 (OP-2).

Proteínas específicas de tumores, que incluyen antígeno de trofoblasto humano, receptor de herceptina, receptor de estrógenos, catepsinas p. ej. catepsina B (presente en el hígado y el bazo).

Proteínas específicas de enfermedades, como antígenos expresados solo en linfocitos T activados: que incluyen LAG-3 (gen de activación de linfocitos), ligando de osteoprotegerina (OPGL) véase *Nature* 402, 304-309; 1999, 30 OX40 (un miembro de la familia de receptores TNF, expresado en linfocitos T activados y la única molécula de linfocitos T coestimuladora conocida por ser regulada específicamente por aumento en las células productoras del virus de la leucemia de linfocitos T humana tipo-I (HTLV-I)). Véase *J Immunol.* 2000 Jul 1; 165(1):263-70; Metaloproteasas (asociadas con artritis/cánceres), que incluyen Drosophila CG6512, paraplejina humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH murina; factores de crecimiento angiogénicos, que incluye factor de crecimiento de 35 fibroblastos ácido (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), factor de crecimiento del endotelio vascular / factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor de crecimiento transformante-a (TGF α), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), angiogenina, interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (P1GF), factor de crecimiento derivado de plaquetas de línea media-BB (PDGF), fractalcina.

40 HSP de proteínas de estrés (proteínas de choque térmico) presentes normalmente en el entorno intracelular. Cuando están presentes extracelularmente, es un indicador de que la célula ha muerto y ha vertido su contenido. Esta muerte celular programada (necrosis) solo se produce cuando como consecuencia de un traumatismo, enfermedad o lesión y por tanto *in vivo*, las HSP extracelulares desencadenan una respuesta del sistema inmunitario que combatirá la infección y la enfermedad. Un ligando específico doble que está unido a HSP extracelular puede 45 estar localizado en un sitio de enfermedad.

Proteínas que intervienen en el transporte de Fc

Receptor de Brambell (también conocido como FcRB)

Este Fc receptor tiene dos funciones, las dos útiles potencialmente para el parto.

Las funciones son

(1) El transporte de IgG desde la madre al niño a través de la placenta

(2) la protección de IgG de la degradación y la prolongación así de la semivida en suero de IgG. Según se cree, el receptor recicla IgG del endosoma.

5 Véase Holliger *et al.*, Nat Biotechnol 1997 Jul; 15(7):632-6.

Los ligandos descritos en la presente memoria pueden diseñarse de manera que sean específicos para las dianas anteriores sin necesitar ningún aumento directo o en la semivida *in vivo*. Por ejemplo, los ligandos según la invención pueden ser específicos para dianas seleccionadas entre las descritas anteriormente que son específicas de tejidos, con lo que permiten un direccionamiento específico del tejido del ligando específico doble, o un monómero dAb que se une a una diana terapéuticamente relevante específica del tejido, con independencia de posibles aumentos en la semivida, aunque estos puedan producirse. Por otra parte, cuando el ligando o monómero dAb se dirige al riñón o el hígado, puede redirigir el ligando o monómero dAb a una vía de aclaramiento alternativa *in vivo* (por ejemplo, el ligando puede dirigirse desde el aclaramiento en el hígado al aclaramiento en el riñón).

Como se describió anteriormente, los ligandos descritos en la presente memoria que comprenden un dominio variable individual como se define en la presente memoria pueden seleccionarse de manera que sean específicos para una diana y preferiblemente pueden tener el atributo añadido de aumentar la semivida de una diana *in vivo*, aunque no es necesario. Un ligando específico doble puede estar compuesto por un dominio variable individual de cadena pesada de anticuerpos que tiene una especificidad de unión a un primer epítipo o antígeno, y también de un dominio variable individual de cadena ligera de anticuerpos que tiene una especificidad de unión a un segundo epítipo o antígeno, en el que uno o los dos de los antígenos pueden ser albúmina sérica, o uno o los dos de los epítipos es un epítipo o epítipos de albúmina sérica. En una realización, los dos epítipos de albúmina sérica son el mismo, en otra realización, cada epítipo de albúmina sérica es diferente.

Además de estos ligandos específicos dobles que tienen el atributo de aumentar la semivida de una diana *in vivo*, en la presente memoria se describen otras formas estructurales de ligandos que tienen o consisten en al menos un dominio variable individual como se define en la presente memoria que tiene el atributo de aumentar la semivida de un ligando de unión a diana *in vivo*, p. ej., por unión a albúmina sérica. Por ejemplo, el ligando puede consistir en, o contener, un dominio variable individual de monómeros como se define en la presente memoria que se une a albúmina sérica; o el ligando puede estar en una forma que comprende múltiples dominios variables individuales como se define en la presente memoria, en el que uno o más de los dominios variables individuales se une a albúmina sérica, es decir, un multímero. Tanto el multímero como el monómero pueden comprender otras entidades además del uno o más dominios variables individuales que se unen a albúmina sérica, p. ej., en forma de una proteína de fusión y/o un conjugado. Dicha proteína de fusión es preferiblemente una cadena única de polipéptidos y puede comprender por ejemplo dos o más dominios variables individuales enlazados como se define en la presente memoria; los dominios variables individuales enlazados pueden ser idénticos o pueden ser diferentes entre sí. Dichas entidades incluyen p. ej., uno o más dominios variables individuales adicionales como se define en la presente memoria, que tienen una especificidad para un antígeno o epítipo distinta de la albúmina sérica, y/o uno o más fármacos, y/o uno o más dominios de unión diana que tienen una especificidad a un antígeno o epítipo distinta de la albúmina sérica y que no son dominios variables individuales como se define en la presente memoria. Dicho multímero puede tener múltiples valencias con respecto a su dominio o dominios variables individuales, p. ej., univalente, divalente, trivalente, tetravalente. Dicho multímero puede tener la forma de una estructura IgG o un ligando específico doble como se define en la presente memoria, así como otras estructuras como IgM, IgE, IgD o IgA, y/o fragmentos de las mismas, que incluyen pero no se limitan a fragmentos como fragmentos scFv, Fab, Fab', etc. El ligando puede modificarse para contener restos adicionales, como una proteína de fusión o un conjugado.

La presente invención proporciona un ligando que comprende un dominio variable individual de anticuerpos, en donde dicho dominio variable individual de anticuerpos comprende la secuencia de aminoácidos dAb7h11 que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 24, Hoja 1, o una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la misma al menos en el 95 %, en donde la semivida beta T del dominio variable individual en cynomolgus es al menos el 50 % de la semivida beta T de albúmina sérica de cynomolgus en cynomolgus.

En la presente memoria se describe un ligando que tiene uno o más dominios variables individuales de cadena ligera de anticuerpos y en el que el uno o más dominios variables individuales de cadena ligera de anticuerpos se unen específicamente a albúmina sérica y tienen una secuencia de aminoácidos de un dominio variable individual de cadena ligera de anticuerpos seleccionada entre, pero preferiblemente no limitada a, el grupo: dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, drdAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3, dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15, dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13, dAb7h14, dAb7p1, dAb7p2, y una secuencia que es al menos idéntica a la misma en el 80 %, o hasta, de forma inclusiva, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad a la misma.

Las realizaciones de ligandos descritas más arriba y en la presente memoria incluyen también aquellos que tienen una estructura que comprende una estructura IgG que tiene cualquier combinación de uno, o dos de los ligandos específicos dobles anteriores, y/o dominios variables individuales que comprenden armazones de no inmunoglobulinas. Dicha estructura de inmunoglobulinas puede tener varias combinaciones de dominios variables
 5 individuales de anticuerpos, que incluyen una estructura IgG que contiene cuatro dominios variables individuales de cadena pesada de anticuerpos, o una estructura IgG que contiene cuatro dominios variables individuales de cadena ligera de anticuerpos, así como una estructura IgG que contiene dos pares de cadenas, conteniendo cada par un dominio variable individual de cadena pesada de anticuerpos y un dominio variable individual de cadena ligera de anticuerpos. Además de estas estructuras IgG, los ligandos descritos en la presente memoria pueden contener uno
 10 o más monómeros de un dominio variable individual, que incluye pero preferiblemente se no limita a los dominios variables individuales enumerados anteriormente, en los que si el ligando contiene más de uno de estos dominios variables individuales, los dominios variables individuales pueden ser idénticos entre sí o no idénticos entre sí.

Las realizaciones de ligandos que comprenden uno o más dominios variables individuales incluyen, pero preferiblemente no se limitan a, los dAb descritos en la presente memoria, monómeros específicos dobles que
 15 comprenden al menos un dominio variable individual, moléculas de IgG específicas dobles que contienen monómeros de cadena única de anticuerpos y moléculas de IgG multivalentes que comprenden monómeros de cadena única de anticuerpos como se describe en la presente memoria. Estas realizaciones pueden comprender además un sitio de unión para un ligando genérico. El ligando genérico puede incluir, pero preferiblemente no se limita a, proteína A, proteína L y proteína G. En dicho ligando específico doble, que incluye los ligandos específicos
 20 dobles presentes en un formato IgG, uno o los dominios variables individuales se unen específicamente a un epítipo o antígeno con una constante de disociación (K_d) que puede seleccionarse entre, pero preferiblemente no se limita a, 1×10^{-3} M o menos, 1×10^{-4} M o menos, 1×10^{-5} M o menos, 1×10^{-6} M o menos, 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos y 1×10^{-9} M o menos, como se determina, por ejemplo, por resonancia por plasmones superficiales. Dicho ligando específico doble, que incluye aquellos ligandos específicos dobles presentes en un formato IgG, puede
 25 contener además una o más entidades que incluyen, pero preferiblemente no se limitan a una etiqueta, una marca y un fármaco. Dicho ligando específico doble, que incluye los ligandos específicos dobles presentes en un formato IgG, así como un ligando multimérico que contiene uno o más monómeros de los dominios variables individuales enumerados anteriormente, puede estar presente en un kit, y en una composición, que incluye una composición farmacéutica, que contiene el ligando específico doble y un vehículo del mismo.

Análogamente, para un ligando que comprende uno o más dominios variables individuales como se describe en la presente memoria, que incluye un ligando en forma monomérica y un ligando en forma multimérica como se define más arriba, el uno o más dominios variables individuales se unen específicamente a un epítipo o antígeno con una constante de disociación (K_d) que puede seleccionarse entre, pero preferiblemente no se limita a, 1×10^{-3} M o
 30 menos, 1×10^{-4} M o menos, 1×10^{-5} M o menos, 1×10^{-6} M o menos, 1×10^{-7} M o menos, 1×10^{-8} M o menos y 1×10^{-9} M o menos, como se determina, por ejemplo, por resonancia por plasmones superficiales. Dicho ligando puede contener además una o más entidades que incluyen, pero preferiblemente no se limitan a una etiqueta, una marca y un fármaco. Dicho ligando puede estar presente en un kit, una composición, que incluye una composición farmacéutica, que contiene el ligando y un vehículo del mismo.

H: Uso de ligandos multiespecíficos según la segunda configuración de la descripción

40 Los ligandos multiespecíficos según el método de la segunda configuración de la presente descripción pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones diagnósticas *in vitro* e *in vivo*, aplicaciones de ensayos y reactivos *in vitro* y similares. Por ejemplo las moléculas de anticuerpos pueden usarse en técnicas de ensayo basadas en anticuerpos, como técnicas ELISA, según métodos conocidos para los expertos en la técnica.

45 Como se alude anteriormente, los ligandos multiespecíficos se usan en procedimientos diagnósticos, profilácticos y terapéuticos. Los anticuerpos multiespecíficos se usan con fines diagnósticos en análisis Western y detección de proteínas *in situ* por procedimientos inmunohistoquímicos estándar; para su uso en estas aplicaciones, los ligandos pueden etiquetarse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Además, dichos polipéptidos de anticuerpos pueden usarse de forma preparatoria en procedimientos de cromatografía de afinidad, cuando forman complejo con
 50 un soporte cromatográfico, como una resina. Todas estas técnicas son bien conocidas para un experto en la técnica.

Los usos diagnósticos de los ligandos multiespecíficos de conformación cerrada incluyen ensayos homogéneos para analitos que aprovechan la capacidad de los ligandos multiespecíficos de conformación cerrada para unirse a dos dianas en competencia, de manera que dos dianas no pueden unirse simultáneamente (una conformación cerrada), o alternativamente su capacidad para unirse a dos dianas simultáneamente (una conformación abierta).

55 Los fabricantes de sistemas de ensayos de diagnóstico e investigación usados en el descubrimiento y tratamiento de fármacos han buscado con mucho interés un formato de inmunoensayo homogéneo verdadero. Los principales mercados de diagnóstico incluyen pruebas humanas en hospitales, consultas y clínicas médicas, laboratorios de referencia comerciales, bancos de sangre y el domicilio, diagnósticos no humanos (por ejemplo pruebas de alimentos, pruebas de agua, pruebas del medio ambiente, biodefensa y pruebas veterinarias), y finalmente
 60 investigación (que incluye desarrollo de fármacos; investigación básica e investigación académica).

En la actualidad todos estos mercados usan sistemas de inmunoensayo que están contruidos en torno a tecnologías de quimioluminiscencia, ELISA, fluorescencia o en casos raros radioinmunoensayo. Cada uno de estos formatos de ensayo requiere una etapa de separación (separación de reactivos unidos y no unidos). En algunos casos, se requieren varias etapas de separación. La inclusión de estas etapas adicionales añade reactivos y automatización, lleva un tiempo e influye en el resultado final de los ensayos. En diagnóstico humano, la etapa de separación puede automatizarse, lo que enmascara el problema, pero no lo elimina. La robótica, los reactivos adicionales, los tiempos de incubación adicionales, y similares añaden un coste y una complejidad considerables. En el desarrollo de fármacos, como el cribado de alto rendimiento, en el que se prueban literalmente millones de muestras a la vez, con niveles muy bajos de molécula de prueba, la inclusión de etapas de separación adicionales puede eliminar la capacidad de realizar un cribado. Sin embargo, si se evita la separación se crea demasiado ruido en la lectura. Así, existe la necesidad de un formato homogéneo verdadero que proporcione sensibilidades en el intervalo que puede obtenerse en los presentes formatos de ensayo. Ventajosamente, un ensayo posee lecturas plenamente cuantitativas con alta sensibilidad y un gran intervalo dinámico. La sensibilidad es un requisito importante, como también reducir la cantidad de muestra requerida. Estas dos características son rasgos que ofrece un sistema homogéneo. Es muy importante en las pruebas en el punto de atención, y en el desarrollo de fármacos en el que las muestras son preciosas. Los sistemas heterogéneos, como los disponibles actualmente en la técnica, necesitan grandes cantidades de muestra y reactivos caros.

Las aplicaciones para ensayos homogéneos incluyen pruebas del cáncer, en las que el mayor ensayo es el de antígeno prostático específico, usado en el cribado en hombres de cáncer de próstata. Otras aplicaciones incluyen pruebas de fertilidad, que proporciona una serie de pruebas para mujeres que intentan quedarse embarazadas en las que se incluye la beta-hcg para embarazo. Las pruebas para enfermedades infecciosas, que incluyen hepatitis, VIH, rubeola y otros virus y microorganismos y las enfermedades de transmisión sexual. Se usan pruebas en bancos de sangre, especialmente pruebas para VIH, hepatitis A, B, C, no A no B. Las pruebas de seguimiento terapéutico de fármacos incluyen los niveles de seguimiento de los fármacos prescritos en pacientes en términos de eficacia y para prevenir la toxicidad, por ejemplo digoxina para arritmias y niveles de fenobarbital en casos psicóticos; teofilina para el asma. Por otra parte, las pruebas diagnósticas son útiles en pruebas de drogas, como las pruebas para cocaína, marihuana y similares. Las pruebas metabólicas se usan para medir la función tiroidea, la anemia y otras funciones y trastornos psicológicos.

Por otra parte, el formato de inmunoensayo homogéneo es útil en la fabricación de ensayos estándar de química clínica. La inclusión de inmunoensayos y ensayos de química en el mismo instrumento resulta altamente ventajosa en las pruebas diagnósticas. Los ensayos químicos adecuados incluyen pruebas de glucosa, colesterol, potasio y similares.

Una aplicación importante adicional para inmunoensayos homogéneos es el descubrimiento y desarrollo de fármacos: el cribado de alto rendimiento incluye pruebas de bibliotecas de química combinatoria frente a dianas en volumen ultraalto. Se detecta la señal, y después se dividen los grupos positivos en grupos más pequeños, y finalmente se prueban en células y después en animales. Los ensayos homogéneos pueden usarse en todos estos tipos de pruebas. En desarrollo de fármacos, especialmente en estudios animales y ensayos clínicos, se hace un uso intenso de los inmunoensayos. Los ensayos homogéneos aceleran y simplifican enormemente estos procedimientos. Otras aplicaciones incluyen pruebas de alimentos y bebidas: pruebas de carnes y otros alimentos en busca de *E. coli*, *salmonella*, etc.; pruebas de agua, que incluyen pruebas en las plantas acuáticas de todos los tipos de contaminantes incluyendo *E. coli*; y pruebas veterinarias.

En una realización extensa, en la presente memoria se describe un ensayo de unión que comprende un agente detectable que está unido a un ligando multiespecífico de conformación cerrada según la invención, y cuyas propiedades detectables están alteradas por la unión de un analito a dicho ligando multiespecífico de conformación cerrada. Dicho ensayo puede estar configurado de varias formas diferentes, cada una de las cuales aprovecha las propiedades anteriores de los ligandos multiespecíficos de conformación cerrada.

El ensayo se basa en el desplazamiento directo o indirecto de un agente por el analito, lo que produce un cambio en las propiedades detectables del agente. Por ejemplo, en el que el agente es una enzima que es capaz de catalizar una reacción que tiene un criterio de valoración detectable, dicha enzima puede estar unida por el ligando de manera que obstruya su sitio activo, inactivando así la enzima. El analito, que también está unido por el ligando multiespecífico de conformación cerrada, desplaza la enzima, volviéndola activa a través de la liberación del sitio activo. A continuación la enzima es capaz de reaccionar con un sustrato, para proporcionar el aumento hasta un suceso detectable. En una realización alternativa, el ligando puede unirse a la enzima fuera del sitio activo, que influye en la conformación de la enzima y modifica así su actividad. Por ejemplo, la estructura del sitio activo puede estar limitada por la unión del ligando, o puede evitarse la unión de cofactores necesarios para la actividad.

La implementación física del ensayo puede adoptar cualquier forma conocida en la técnica. Por ejemplo, el complejo de ligando multiespecífico de conformación cerrada/enzima puede proporcionarse en una tira de ensayo; el sustrato puede proporcionarse en una región diferente de la tira de ensayo, y se deja que un disolvente que contiene el analito migre a través del complejo ligando/enzima, desplazando la enzima, y llevándolo a la región del sustrato para producir una señal. Alternativamente, el complejo de ligando/enzima puede proporcionarse en una varilla de prueba o en otra fase sólida, y sumergirse en una solución de analito/sustrato, liberando la enzima en la solución en

respuesta a la presencia de analito.

Dado que cada molécula de analito libera potencialmente una molécula de enzima, el ensayo es cuantitativo, con la fuerza de la señal generada en un tiempo dado dependiente de la concentración de analito en la solución.

Son posibles configuraciones adicionales que usan el analito en una conformación cerrada. Por ejemplo, el ligando
5 multiespecífico de conformación cerrada puede configurarse para unirse a una enzima en un sitio alostérico, activando así la enzima. En dicha realización, la enzima está activa en ausencia de analito. La adición del analito desplaza la enzima y elimina la activación alostérica, inactivando así la enzima.

En el contexto de las realizaciones anteriores que emplean la actividad enzimática como una medida de la
10 concentración de analito, la activación o inactivación de la enzima se refiere a un aumento o disminución en la actividad de la enzima, medida como la capacidad de la enzima de catalizar una reacción de generación de señal. Por ejemplo, la enzima puede catalizar la conversión de un sustrato indetectable en una forma detectable del mismo. Por ejemplo, en la técnica se emplea ampliamente peroxidasa de rábano picante junto con sustratos cromógenos o quimioluminiscentes, que están disponibles comercialmente. El nivel de aumento o disminución de la actividad de la
15 enzima puede estar entre el 10 % y el 100 %, por ejemplo el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 %; en el caso de un aumento en la actividad, el aumento puede ser de más del 100 %, es decir, el 200 %, el 300 %, el 500 % o más, o puede no ser mensurable como un porcentaje si la actividad de base de la enzima inhibida es indetectable.

En una configuración adicional, el ligando multiespecífico de conformación cerrada puede unirse al sustrato de un
20 par de enzima/sustrato, más que a la enzima. El sustrato no está por tanto disponible para la enzima hasta que se libera del ligando multiespecífico de conformación cerrada a través de la unión del analito. Las implementaciones para esta configuración son como para las configuraciones que se unen a la enzima.

Por otra parte, el ensayo puede configurarse para unirse a una molécula fluorescente, como una fluoresceína u otro
25 fluoróforo, en una conformación de manera que la fluorescencia se inactiva en la unión al ligando. En este caso, la unión del analito al ligando desplazará la molécula fluorescente, produciendo así una señal. Las alternativas a las moléculas fluorescentes que son útiles en la presente invención incluyen agentes luminiscentes, como luciferina/luciferasa, y agentes cromógenos, que incluyen agentes usados comúnmente en inmunoensayos como HRP.

Los usos terapéuticos y profilácticos de los ligandos multiespecíficos preparados según la descripción implican la
30 administración de ligandos según la invención a un mamífero receptor, como un ser humano. La multiespecificidad puede permitir que los anticuerpos se unan al antígeno multimérico con gran avidéz. Los ligandos multiespecíficos pueden permitir la reticulación de dos antígenos, por ejemplo en el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos para mediar en la destrucción de líneas de células tumorales.

Se prefieren ligandos sustancialmente puros o proteínas de unión de los mismos, por ejemplo monómeros dAb, de al
35 menos el 90 al 95 % de homogeneidad para su administración a un mamífero, y lo más preferido es del 98 al 99 % o más de homogeneidad para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los ligandos pueden usarse con fines diagnósticos o terapéuticos (lo que incluye forma extracorpórea) o en el desarrollo y la realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) *Immunological Methods*, Volúmenes I y II, Academic Press, NY).

40 Los ligandos encontrarán uso normalmente en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunitarios (que incluyen, pero preferiblemente no se limitan a, diabetes tipo I, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia grave).

En la presente solicitud, el término "prevención" implica la administración de la composición protectora antes de la
45 inducción de la enfermedad. "Supresión" se refiere a la administración de la composición después de un suceso inductor, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que se hayan manifestado los síntomas de la enfermedad.

Se dispone de sistemas de modelos de animales que pueden usarse para cribar la eficacia de los anticuerpos o las
50 proteínas de unión de los mismos en la protección o el tratamiento de la enfermedad. Los métodos para las pruebas de lupus eritematoso sistémico (LES) en ratones sensibles son conocidos en la técnica (Knight *et al.* (1978) *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten *et al.* (1978) *New Eng. J. Med.*, 299: 515). La miastenia grave (MG) se prueba en ratones hembra SJL/J induciendo la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom *et al.* (1988) *Adv. Immunol.*, 42: 233). La artritis es inducida en una cepa sensible de ratones por inyección de colágeno tipo II (Stuart *et al.* (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Se ha descrito un modelo por el que se induce una artritis
55 adyuvante en ratas sensibles por inyección de proteínas de choque térmico micobacterianas (Van Eden *et al.* (1988) *Nature*, 331: 171). La tiroiditis se induce en ratones mediante la administración de tiroglobulina como se ha descrito (Maron *et al.* (1980) *J. Exp. Med.*, 152: 1115). La diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) aparece naturalmente o puede inducirse en ciertas cepas de ratones como las descritas por Kanasawa *et al.* (1984)

Diabetologia, 27: 113. La EAE en ratón y rata actúa como modelo para EM en seres humanos. En este modelo, la enfermedad desmielinizante se induce por administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) *Textbook of Immunopathology*, Mischer *et al.*, eds., Grune y Stratton, Nueva York, pp. 179-213; McFarlin *et al.* (1973) *Science*, 179: 478; y Satoh *et al.* (1987) *J. Immunol.*, 138: 179).

- 5 Un ligando que comprende un dominio variable individual, o una composición del mismo, que se une específicamente a vWF, p. ej., vWF humano, un dominio vWF A1, el dominio A1 de vWF activado o el dominio A3 de vWF, puede comprender además un agente trombolítico. Este agente trombolítico puede estar unido de forma covalente o no covalente a un dominio variable individual, en particular a un dominio variable individual de anticuerpos, por medios covalentes o no covalentes conocidos para un experto en la técnica. Los medios no covalentes incluyen la interacción de proteínas como biotina/estreptavidina, o por medio de un inmunoconjugado.
- 10 Alternativamente, el agente trombolítico puede administrarse simultáneamente, por separado o en secuencia con respecto a un ligando que consiste en o que comprende un dominio variable individual que se une a vWF o un dominio vWF como se describió anteriormente, o una composición de los mismos. Los agentes trombolíticos según la invención pueden incluir, por ejemplo, estafilocinasa, activador plasminógeno de tejido, estreptocinasa,
- 15 estreptocinasa de cadena única, urocinasa y complejo de estreptocinasa plasminógeno acilo.

- También se describen en la presente memoria dispositivos médicos invasivos recubiertos por un dominio variable individual, o un ligando que comprende un dominio variable individual, o una composición del mismo, o un dominio variable individual que procede de un método de cribado descrito en la presente memoria. Los ejemplos no limitativos de los dispositivos incluyen intubación quirúrgica, dispositivos de oclusión, dispositivos protésicos.
- 20 aplicación para dichos dispositivos incluye procedimientos quirúrgicos que requieren una modulación de la agregación mediada por plaquetas en torno al sitio de invasión (p. ej. un dispositivo recubierto con un dominio variable individual que se une específicamente a vWF) o una modulación de la inflamación (p. ej. un dispositivo recubierto con un dominio variable individual que se une específicamente a TNF alfa).

- En general, los presentes ligandos se usarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Normalmente, estos vehículos incluyen soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, cualquiera que incluya medio salino y/o con medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y solución de Ringer con lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si es necesario conservar un complejo de polipéptidos en suspensión, pueden elegirse entre espesantes como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.
- 25 Los vehículos intravenosos incluyen agentes de reposición de líquidos y nutrientes y de reposición de electrolitos, como los basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, como antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelación y gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición).

- Los ligandos de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas por separado o en conjunción con otros agentes. Estos pueden incluir diversos fármacos inmunoterapéuticos, como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos agentes citotóxicos u otros en conjunción con los ligandos de la presente invención, o incluso combinaciones de ligandos según la presente invención que tienen diferentes especificidades, como ligandos seleccionados usando diferentes antígenos o epítomos diana, se incluyan o no en reserva antes de la administración.
- 35 La vía de administración de las composiciones farmacéuticas según la invención puede ser cualquiera de las conocidas comúnmente por los expertos en la técnica. Para terapia, que incluye sin limitación inmunoterapia, los ligandos seleccionados de los mismos de la invención pueden administrarse a cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándar. La administración puede ser mediante cualquier modo apropiado, lo que incluye parenteral, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal, transdérmico, por vía pulmonar, o también, de forma apropiada, por
- 40 infusión directa con un catéter. La dosis y la frecuencia de administración dependerán de la edad, el sexo y el estado del paciente, la administración concurrente de otros fármacos, las contraindicaciones y otros parámetros que serán tenidos en cuenta por el clínico.

- Los ligandos de la presente invención pueden ser liofilizados para su almacenamiento y reconstituidos en un vehículo adecuado antes del uso. Esta técnica ha demostrado ser eficaz en las inmunoglobulinas convencionales y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Los expertos en la técnica observarán que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a diversos grados de pérdida de actividad de anticuerpos (p. ej. con las inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM suelen tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y pueden tener que ajustarse los niveles de uso en sentido ascendente para compensar.
- 50

- Las composiciones que contienen los presentes ligandos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En algunas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para conseguir al menos la inhibición parcial, la supresión, la modulación, la destrucción o algún otro parámetro mensurable, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para conseguir esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado

general del propio sistema inmunitario del paciente, pero en general estarán comprendidas entre 0,005 y 5,0 mg de ligando, p. ej. anticuerpo, receptor (p. ej. un receptor de linfocitos T) o proteína de unión del mismo por kilogramo de peso corporal, usándose más comúnmente dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, pueden administrarse también composiciones que contienen los presentes ligandos o cócteles de los mismos en 5 dosificaciones similares o ligeramente inferiores.

El tratamiento realizado usando las composiciones descritas en la presente memoria se considera "efectivo" si se reduce uno o más síntomas (p. ej., en al menos el 10 % o al menos un punto en la escala de valoración clínica), con respecto a dichos síntomas presentes antes del tratamiento, o en relación con dichos síntomas en un individuo (ser humano o modelo animal) no tratado con dicha composición. Los síntomas variarán obviamente según la 10 enfermedad o trastorno diana, pero pueden ser medidos por un técnico o un clínico experto. Dichos síntomas pueden medirse, por ejemplo, supervisando el nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o el trastorno (p. ej., valores de una enzima o metabolito correlacionados con la enfermedad, números de células afectados, etc.), mediante vigilancia de las manifestaciones clínicas (p. ej., inflamación, tamaño del tumor, etc.), o por una escala de valoración clínica aceptada, por ejemplo, la Escala de Estado de Discapacidad Ampliada (para 15 esclerosis múltiple), el Cuestionario de Irvine de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (valoración de 32 puntos que evalúa la calidad de vida con respecto a la función intestinal, los síntomas sistémicos, la función social y el estado emocional, con puntuación comprendida entre 32 y 224, de manera que las valoraciones más altas indican mejor calidad de vida), la Escala de Calidad de Vida de Artritis Reumatoide o la escala de valoración clínica aceptada según se conoce en el campo. Una reducción sostenida (p. ej., un día o más, preferiblemente más tiempo) en los 20 síntomas de la enfermedad o el trastorno en al menos 10 % o en uno o más puntos en una escala clínica dada es indicativo de tratamiento "eficaz". Análogamente, la profilaxis realizada usando una composición como se describe en la presente memoria es "eficaz" si el inicio o la gravedad de uno o más síntomas se retrasa, se reduce o se elimina con respecto a dichos síntomas en un individuo similar (ser humano o modelo animal) no tratado con la composición.

25 Una composición que contiene un ligando o un cóctel del mismo según la presente invención puede usarse en escenarios de profilaxis o terapia para contribuir a la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población seleccionada de células diana en un mamífero. Además, los repertorios de polipéptidos seleccionados descritos en la presente memoria pueden usarse de forma extracorpórea o selectivamente *in vitro* para destruir, agotar o eliminar eficazmente por otros medios una población de células diana de una colección heterogénea de 30 células. La sangre de un mamífero puede combinarse de forma extracorpórea con los ligandos, p. ej. anticuerpos, receptores de superficie celular o proteínas de unión de los mismos en los que las células no deseadas son destruidas o eliminadas por otros medios de la sangre para el retorno al mamífero de acuerdo con técnicas estándar.

Selección y la caracterización de ligandos que comprenden un dominio variable individual para la unión a albúmina sérica a partir de un conjunto de especies

35 Un ligando puede comprender uno o más dominios variables individuales, p. ej., dominios variables individuales de inmunoglobulinas y/o dominios variables individuales de no inmunoglobulinas, en el que al menos uno de los dominios variables individuales está unido específicamente a albúmina sérica de un ser humano, así como de especies no humanas. En una realización, el dominio variable individual se une específicamente a solo albúmina sérica que es endógena del ser humano. En otra realización, el dominio variable individual se une específicamente a 40 albúmina sérica de una especie no humana. Alternativamente, el dominio variable individual se une específicamente a una albúmina sérica que es endógena del ser humano, así como a una albúmina sérica que es endógena de una o más especies no humanas. Como ejemplo no limitativo, dicho dominio variable individual puede unirse específicamente a albúmina sérica endógena del ser humano y cynomolgus, o a albúmina sérica endógena del ser humano y rata, o a albúmina sérica de ser humano y ratón, o a albúmina sérica de ser humano y cerdo. 45 Alternativamente, el dominio variable individual está unido específicamente a dos o más albúminas séricas de dos o más especies no humanas. Como se emplea en la presente memoria, la albúmina sérica puede expresarse mediante un gen endógeno de una especie, es decir, albúmina sérica natural, y/o por un equivalente recombinante de la misma. En una realización, la albúmina sérica incluye fragmentos, análogos y derivados de albúmina sérica natural y recombinante. Dichos fragmentos de albúmina sérica incluyen fragmentos que contienen dominio I, dominio 50 II y/o dominio III, o combinaciones de uno o dos o más de cada uno de los de dominios I, II y III de albúmina sérica, preferiblemente albúmina sérica humana. El dominio II de albúmina sérica se prefiere como diana para el dominio variable individual como se define en la presente memoria. Otras combinaciones preferidas son Dominio I y Dominio II; Dominio I y Dominio III; Dominio II y Dominio III; y Dominio I en solitario; Dominio II en solitario; y Dominio III en solitario; y Dominio I y Dominio II y Dominio III. En una realización, la albúmina sérica es albúmina sérica 55 recombinante expresada de forma exógena en un hospedador no humano, como un hospedador animal, o un hospedador unicelular como levaduras o bacterias.

La especie de la cual la albúmina sérica es endógena incluye cualquier especie que expresa albúmina sérica endógena, lo que incluye, pero preferiblemente no se limita a, las especies de hospedador humano, de ratón, murino, de rata, de cynomolgus, porcino, de perro, de gato, de caballo, de cabra y de hámster. En algunos casos se 60 excluye la albúmina sérica endógena de camello o llama.

En una realización, este dominio variable individual está unido específicamente a albúmina sérica que es endógena

de una primera especie no humana con un valor de K_d que está comprendido entre 10 veces del valor K_d con que se une específicamente (es decir, con reacción cruzada) a al menos una albúmina sérica que es endógena de una segunda especie no humana. Alternativamente, este dominio variable individual está unido específicamente a albúmina sérica que es endógena de la primera especie no humana con un valor de K_d que está en 15, 20, 25, 30, 50 o hasta aproximadamente 100 veces el valor K_d con que se une específicamente (es decir, con reacción cruzada) a al menos una albúmina sérica que es endógena de la segunda especie no humana. En algunas realizaciones, el dominio variable individual está unido específicamente a albúmina sérica con una K_{off} de al menos $5 \times 10^{-1} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-7} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-8} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-9} \text{ S}^{-1}$, $5 \times 10^{-10} \text{ S}^{-1}$, o menos, preferiblemente con una K_{off} comprendida entre $1 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$ y $1 \times 10^{-8} \text{ S}^{-1}$.

Por ejemplo, dicho ligando puede incluir un dominio variable individual de inmunoglobulinas, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulinas está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de ratón, y en el que la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica de ratón en un hospedador de ratón. En una versión de dicho ligando, el dominio de unión a epítomos contiene un armazón de no inmunoglobulinas que está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de ratón, y en donde la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica de ratón en un hospedador de ratón. La frase "sustancialmente la misma" significa que el ligando tiene una semividada beta T en un hospedador de ratón que es al menos el 50 % de la de la albúmina sérica de ratón en un hospedador de ratón, que es al menos el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 100 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, y hasta el 150 % que la de la semividada beta T de albúmina sérica de ratón en un hospedador de ratón. El armazón de no inmunoglobulinas puede incluir opcionalmente fragmentos de un dominio variable individual de anticuerpos, como una o más de las regiones CDR de un dominio variable de anticuerpos, que incluye un dominio variable individual de anticuerpos que tiene una semividada beta T en un hospedador humano que es al menos el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, o hasta el 150 % que la de la semividada beta T de albúmina sérica humana en un hospedador humano.

Por ejemplo, una realización es un dominio variable individual, en el que el dominio variable individual está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de rata, y en el que la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica de rata en un hospedador de rata. En una versión de dicho ligando, el dominio de unión variable individual contiene un armazón de no inmunoglobulinas que está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de rata, y en donde la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica de rata en un hospedador de rata. La frase "sustancialmente la misma" significa que el ligando tiene una semividada beta T en un hospedador de ratón que es al menos el 50 % que la de albúmina sérica de rata en un hospedador de rata, que es hasta el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 100 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, hasta el 150 % que la de la semividada beta T de albúmina sérica de rata en un hospedador de rata. El armazón de no inmunoglobulinas puede incluir opcionalmente fragmentos de un dominio variable individual de anticuerpos, como una o más de las regiones CDR de un dominio variable de anticuerpos.

Por ejemplo, un ligando puede incluir un dominio variable individual de inmunoglobulinas, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulinas está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica porcina, y en el que la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica porcina en un hospedador porcino. En una versión de un ligando, el dominio de unión a epítomos contiene un armazón de no inmunoglobulinas que está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica porcina, y en donde la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica porcina en un hospedador porcino. La frase "sustancialmente la misma" significa que el ligando tiene una semividada beta T en un hospedador porcino que es al menos el 50 % que la de albúmina sérica porcina en un hospedador porcino, que es hasta el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 100 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, hasta el 150 % que la de la semividada beta T de albúmina sérica porcina en un hospedador porcino. El armazón de no inmunoglobulinas puede incluir opcionalmente fragmentos de un dominio variable individual de anticuerpos, como una o más de las regiones CDR de un dominio variable de anticuerpos, que incluye un dominio variable individual de anticuerpos.

Por ejemplo, un ligando puede incluir un dominio variable individual de inmunoglobulinas, en el que el dominio variable individual de inmunoglobulinas está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de cynomolgus, y en el que la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica de cynomolgus en un hospedador cynomolgus. En una versión de un ligando, el dominio que se une a albúmina sérica contiene un armazón de no inmunoglobulinas que está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de cynomolgus, y en donde la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica de cynomolgus en un hospedador cynomolgus. La frase "sustancialmente la misma" significa que el ligando tiene una semividada beta T en un hospedador cynomolgus que es al menos el 50 % de la de la albúmina sérica de cynomolgus en un hospedador cynomolgus, que es hasta el 55 %, el 60 %, el 65 %, el

70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 100 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, o hasta el 150 % que la de la semivida beta T de albúmina sérica de cynomolgus en un hospedador cynomolgus.

El armazón de no inmunoglobulinas puede incluir opcionalmente fragmentos de un dominio variable individual de anticuerpos, como una o más de las regiones CDR de un dominio variable de anticuerpos.

En una realización, un ligando y/o ligando específico doble contiene un dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica que es endógena del ser humano, tiene una semivida beta T en un hospedador humano que es al menos el 50 % de la de la albúmina sérica humana en un hospedador humano, hasta el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 100 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 % o hasta el 150 % que la de la semivida beta T de albúmina sérica humana en un hospedador humano. En una realización preferida, el dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica que es endógena de una especie no humana, tiene una semivida beta T en su hospedador no humano respectivo que es al menos el 50 % que la de la albúmina sérica no humana en su hospedador no humano respectivo, hasta el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 100 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, o hasta el 150 % que la de la semivida beta T de la albúmina sérica no humana en su hospedador no humano respectivo. En una realización preferida, el dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica que es endógena del ser humano, y que también se une específicamente a albúmina sérica de al menos una especie no humana, tiene una semivida beta T en un hospedador humano que es hasta el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, o hasta el 150 % de albúmina sérica humana en un hospedador humano, y una semivida beta T en el hospedador no humano que es hasta el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 92 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 100 %, el 101 %, el 102 %, el 105 %, el 110 %, el 125 %, o hasta el 150 % de la albúmina sérica no humana en su hospedador no humano respectivo. En algunas realizaciones, la semivida beta T del dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica puede ser de solo 2 horas hasta y que incluye 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, 14 días, 16 días, 18 días, hasta 21 días o más. En un hospedador humano, así como un hospedador no humano como un hospedador porcino, cynomolgus, de rata, murino, de ratón, la semivida beta T del dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica puede ser de solo 2 horas hasta y que incluye 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, 14 días, 16 días, 18 días, hasta 21 días, o más. Otras semividas beta T preferidas de un ligando que comprende un dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica incluyen: en un hospedador de mono de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, 6, 7 u 8 días, que incluye de solo 2 horas, hasta y que incluye 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, 14 días, 16 días, 18 días, hasta 21 días. En un hospedador de rata o ratón, la semivida beta T del dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica puede ser de solo 40 horas hasta aproximadamente 75 horas, e incluye solo 2 horas hasta y que incluye 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 12 días, 14 días, 16 días, 18 días, hasta 21 días.

Un dominio variable individual mencionado anteriormente puede unirse también de forma adicional específicamente a albúmina sérica humana con una K_{off} de al menos $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$, o menos, preferiblemente con una K_{off} comprendida entre $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ y $1 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$. Los dominios variables individuales que se unen específicamente a albúmina sérica humana y a albúmina sérica que es endógena de una especie no humana, puede unirse además a albúmina sérica que es endógena de una tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena o décima especie no humana. En una realización no limitativa, el dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de rata, está unido además específicamente a albúmina sérica de cynomolgus. En otra realización no limitativa, el dominio variable individual que está unido específicamente a albúmina sérica humana y albúmina sérica de ratón, está unido además específicamente a albúmina sérica de cynomolgus.

Como se describe en la presente memoria, un ligando que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, puede comprender además una o más entidades seleccionadas entre, pero preferiblemente no limitadas a una etiqueta, una marca, un dominio variable individual adicional, un dAb, un anticuerpo, y un fragmento de anticuerpo, un marcador y un fármaco. Una o más de estas entidades puede estar situada en el extremo COOH o en el extremo N o en el extremo N y en el extremo COOH del ligando que comprende el dominio variable individual, (ya sea un dominio variable individual de inmunoglobulinas o de no inmunoglobulinas). Una o más de estas entidades puede estar situada en el extremo COOH, o el extremo N, o en el extremo N y el extremo COOH del dominio variable individual que se une específicamente a albúmina sérica del ligando que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la

presente memoria). Los ejemplos no limitativos de marcas que pueden colocarse en uno o en los dos de estos extremos incluyen una marca HA, his o a myc. Las entidades, que incluyen una o más marcas, etiquetas y fármacos, pueden estar unidas al ligando que contiene un dominio variable individual (monómero) o a más de un dominio variable individual (multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria), que se une a albúmina sérica, ya sea directamente o a través de grupos enlazadores como se describe en un apartado independiente posterior.

Un ligando que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, o que se une específicamente a albúmina sérica humana y a al menos una albúmina sérica no humana, puede unirse específicamente a uno o más de entre Dominio I y/o Dominio II y/o Dominio III de albúmina sérica humana, como se describe más adelante en detalle. Además de contener uno o más dominios variables individuales (por ejemplo, un dominio variable individual de inmunoglobulinas de unión a albúmina sérica de inmunoglobulinas o un dominio variable individual no de inmunoglobulinas de unión a albúmina sérica) que está unido específicamente a una albúmina sérica, como albúmina sérica humana, o que se une específicamente a albúmina sérica humana y al menos una albúmina sérica no humana, el ligando puede contener uno o más dominios adicionales capaces de unir específicamente un antígeno y/o epítipo distinto de albúmina sérica, seleccionándose el antígeno o epítipo entre el grupo que consiste en cualquier proteína animal, que incluye citocinas, y/o antígenos derivados de microorganismos, patógenos, organismos unicelulares, insectos, virus, algas y plantas. Estos uno o más dominios adicionales que se unen a un resto distinto de albúmina sérica pueden ser a dominio de unión no de inmunoglobulinas, un dominio variable individual no de inmunoglobulinas y/o un dominio variable individual de inmunoglobulinas.

También se abarca en la presente memoria un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los ligandos descritos en la presente memoria, p. ej., un ligando que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (p. ej., multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, o que se une específicamente a albúmina sérica humana y al menos una albúmina sérica no humana, o fragmentos funcionalmente activos de los mismos. También se comprende en la presente memoria un vector y/o un vector de expresión del mismo, una célula hospedadora que comprende el vector, p. ej., una célula de planta o animal y/o una línea celular transformada con un vector, un método de expresión y/o producción de uno o más ligandos que contienen un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (p. ej., multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, o fragmento o fragmentos de la misma codificados por dichos vectores, que incluyen en algunos casos el cultivo de la célula hospedadora de manera que el uno o más ligandos o fragmentos de los mismos se expresan y opcionalmente recuperan el ligando que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (p. ej., multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, del medio de cultivo de la célula hospedadora. También se comprenden métodos de contacto de un ligando descrito en la presente memoria con albúmina sérica, que incluye albúmina sérica y/o albúmina o albúminas séricas no humanas, y/o una o más dianas distintas de albúmina sérica, en el que las dianas incluyen moléculas biológicamente activas, e incluyen proteínas animales, citocinas como se indica anteriormente, e incluyen métodos en los que la puesta en contacto es *in vitro* así como la administración de cualquiera de los ligandos descritos en la presente memoria a un animal o célula hospedadores individuales *in vivo* y/o *ex vivo*. Preferiblemente, la administración de ligandos descritos en la presente memoria que comprenden un dominio variable individual (inmunoglobulina o no inmunoglobulina) dirigidos a albúmina sérica y/o albúmina o albúminas séricas no humanas, y uno o más dominios dirigidos a una o más dianas distintas de albúmina sérica, aumentará la semivida, que incluye la semivida beta T, del ligando antidiaria. En la presente memoria se describen moléculas de ácidos nucleicos que codifican el dominio individual que contiene ligandos o fragmentos de los mismos, que incluyen fragmentos funcionales de los mismos. En la presente memoria se describen vectores que codifican las moléculas de ácidos nucleicos, que incluyen pero preferiblemente no se limitan a vectores de expresión, como las células hospedadoras de una línea germinal u organismo que contiene uno o más de estos vectores de expresión. También se describen métodos para producir cualquier dominio individual que contiene ligandos, lo que incluye, pero preferiblemente no se limita a cualquiera de los ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras mencionados antes.

Cartografía de epítipos de albúmina sérica

Las albúminas séricas de especies de mamíferos tienen una estructura similar, que contiene tres dominios predominantes con un plegamiento y patrón de enlaces de disulfuro similares, como se destaca en la Figura 25. Se cree que las proteínas deben proceder de dos episodios de duplicación en tándem, y de la posterior diversificación de residuos.

La estructura de la albúmina sérica humana se ha resuelto por cristalografía de rayos X, con/sin variedad de ligandos unidos:

60 • Atomic structure and chemistry of human serum albumin. He XM, Carter DC.

- *Nature*. 1992; 358: 209-15. Erratas en: *Nature* 1993; 364: 362.
- Atomic structure and chemistry of human serum albumin. He XM, Carter DC; *J Mol Biol*. 2001; 314: 955-60.
- Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. Petitpas I, Grune T, Bhattacharya AA, Curry S.; *J Biol Chem*. 2001; 276: 22804-9.

5 Se ha demostrado que la albúmina sérica humana es una molécula con forma de corazón. Los dominios individuales, denominados I, II y III, son predominantemente helicoidales, y cada uno está compuesto por dos subdominios, denominados IA, IB, IIA, 2B, IIIA y IIIB. Están unidos por hélices aleatorias flexibles.

En la presente memoria se describe un ligando que contiene uno o más dominios variables individuales que están unidos específicamente a un dominio II de albúmina sérica humana. El dominio variable individual puede ser un dominio variable individual de anticuerpos VH. El dominio variable individual puede ser un dominio variable individual de anticuerpos VHH. El dominio variable individual VH puede ser un dominio variable individual VH3. El dominio variable individual VH3 puede ser un dominio variable individual VH3 humano. El ligando puede de forma alternativa, o adicional, incluir un dominio variable individual que es un dominio variable individual de anticuerpos VKappa, que incluye uno de los siguientes: DOM7h-1, DOM7h-8, DOM7h-9, DOM7h-11, DOM7h-12, DOM7h-13, DOM7h-14. 10 DOM7r-3 y DOM7r-16, o un dominio variable individual de anticuerpos VKappa que tiene un dominio que tiene una secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % de identidad o superior.

El dominio variable individual de anticuerpos puede incluir un conjunto de cuatro regiones marco (FR) de Kabat, que están codificadas por el anticuerpo VH, preferiblemente segmentos génicos de anticuerpos de línea germinal marco 20 VH3. El marco VH3 se selecciona entre el grupo que consiste en DP47, DP38 y DP45. El dominio variable individual de anticuerpos puede incluir un conjunto de cuatro regiones marco (FR) Kabat que son codificadas por un marco VL de anticuerpos, preferiblemente un segmento génico de anticuerpos de línea germinal de marco VKappa. Preferiblemente, el marco Kappa es DPK9.

El ligando que contiene uno o más dominios variables individuales que se unen específicamente al Dominio II de 25 albúmina sérica humana puede incluir además uno o más dominios capaces de unirse específicamente a un resto distinto de albúmina sérica, y puede comprender además una o más entidades que incluyen uno o más de una etiqueta, una marca y un fármaco. El uno o más dominios capaces de unirse específicamente a un resto distinto de albúmina sérica pueden ser un dominio variable individual de inmunoglobulinas. En la presente memoria se describe también un ligando que contiene uno o más dominios variables individuales que están unidos específicamente a un 30 dominio II de albúmina sérica humana, incluyendo el dominio un armazón de no inmunoglobulinas y regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3, o en el que al menos una de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 es de un dominio variable individual de un dominio variable individual de anticuerpos que se une un dominio II de albúmina sérica humana. Los armazones de no inmunoglobulinas incluyen, pero preferiblemente no se limitan a, CTLA-4, lipocalina, proteína A estafilocócica (SPA), Affibody™, Avímeros™, GroEL y fibronectina.

35 El ligando que contiene uno o más dominios variables individuales que están unidos específicamente a un dominio II de albúmina sérica humana incluye aquellos dominios que se unen específicamente a albúmina sérica humana con una Kd inferior o igual a 300 nM. El ligando que contiene uno o más dominios variables individuales que están unidos específicamente a un dominio II de albúmina sérica humana puede comprender además una o más entidades que incluyen uno o más de una etiqueta, una marca y un fármaco. La marca puede incluir una o más de 40 marcas HC o myc en el extremo C o marcas HA o myc en el extremo N.

La albúmina sérica tiene una semivida en suero larga comparada con otras proteínas séricas, junto con una relación positiva entre concentración sérica y tasas catabólicas fraccionarias (es decir, cuanto mayor es la concentración de SA, más cantidad se degrada), una propiedad que comparte con IgG. Recientemente se ha descubierto que IgG y la albúmina sérica comparten un mecanismo de reciclado, mediado por el receptor Fc neonatal FcRn. FcRn es un 45 miembro de la familia MHC de tipo I, compuesto por un heterodímero de la cadena de FCRGT anclada a la membrana, y una microglobulina beta-2 no unida a membrana. Los ratones mutantes inactivados de microglobulina FcRn o beta-2 no expresan FcRn funcional, y muestran una velocidad de biosíntesis incrementada de albúmina sérica (aumento ~20 %), y un mayor catabolismo de albúmina sérica, lo que conduce a un nivel sérico inferior del 40 % de albúmina sérica, con una semivida más corta (Chaudhry *et al* 2005). En los seres humanos, se ha comprobado 50 que las mutaciones en la microglobulina beta-2 proporcionan niveles de FcRn funcionales muy reducidos y en último término deficiencia de IgG e hipoalbuminemia, caracterizado por una semivida en suero reducida de HSA (Wani *et al*. 2006, PNAS).

Sin querer estar limitado por ninguna teoría, el mecanismo propuesto para salvamento mediado por FcRn es el siguiente:

55 1. Se someten proteínas plasmáticas a pinocitosis mediante células del revestimiento endotelial de todos los vasos sanguíneos, y tal vez células activas en términos de pinocitosis del compartimento extravascular. Esta es una etapa inespecífica, y se captarán todas las proteínas en circulación. FcRn tiene una afinidad muy baja por la albúmina (y la IgG) a pH sérico, aproximadamente pH 7,4.

2. Una vez sometida a pinocitosis, la vesícula formada se acidifica a pH 5,0. En condiciones ácidas, FcRn tiene una mayor afinidad por la albúmina, y se une a albúmina, y también a IgG. La albúmina y la IgG se unen así al receptor de FcRn. FcRn se une a la albúmina sérica humana en un sitio en el Dominio III, por medio de un sitio distinto a aquel por el que se une a IgG.

5 3. Se produce un episodio de ordenamiento, por el que la mayoría de las proteínas no unidas a receptor se ordenan en un endosoma, en el que la mayoría de las proteínas serán direccionadas para degradación. La albúmina y la IgG unidas al receptor se ordenan en una vesícula direccionada para la superficie celular, y así se evitan la degradación.

4. La vesícula direccionada a la superficie celular se fusiona con la superficie celular, o se fusiona brevemente con la membrana celular. En estas condiciones, el pH del endosoma aumenta para acercarse a pH 7,4, la afinidad de FcRn por la albúmina se reduce, y la albúmina se libera de nuevo a la circulación.

Se puede definir por tanto un claro conjunto de parámetros deseables para que cualquier proteína de unión SA tenga una semivida máxima. Estos parámetros pueden ilustrarse claramente usando el receptor de salvamento de la albúmina sérica FcRn como modelo, aunque también se aplicará a otros receptores que median en la prolongación de la semivida.

15 • La afinidad de la unión a albúmina sérica será preferiblemente de tal forma que la proteína de unión SA no se disocia de la albúmina mientras que experimenta un filtrado glomerular en el riñón, minimizando así la pérdida en la orina, y/o

• La unión a SA no tendrá preferiblemente un efecto perjudicial en la unión de albúmina sérica a cualquier receptor responsable del mantenimiento de los niveles de albúmina sérica en la circulación, ya que inhibiría el reciclado y, con ello, reduciría la semivida de la albúmina sérica y del ligante SA. Así los dAb de unión a SA se unen preferiblemente a un epítipo distinto a aquel al que se unen mediante FcRn en HSA dominio III, y el complejo SA/dAb es capaz preferiblemente de acoplarse a FcRn, y/o

• La unión a SA se mantendrá preferiblemente en las condiciones en las que el receptor y el complejo de ligante SA/SA unido se ordenan o se reciclan. Se ha demostrado que el pH endosómico se aproxima a pH 5,0, y por tanto es deseable una unión estable del dAb a la albúmina sérica para pH 7,4 y pH 5,0.

Como se ilustra en el Ejemplo 15 más adelante, la mayoría de los dAb se unen al 2º dominio de HSA y por tanto no se espera que compitan con la unión de albúmina sérica humana a FcRn. Dos dAb (DOM7h-27 y DOM7h-30) se unen al Dominio III.

Un dAb anti-SA que conserva afinidad suficiente para SA a un pH intervalo de 7,4 a 5,0.

30 Además de la afinidad por SA, así como en ausencia de competencia con la formación de complejos SA:FcRn, los dAb específicos de albúmina sérica mantendrán preferiblemente afinidad por SA dentro de un pH intervalo de pH 7,4 en el suero a pH 5,0 en el endosoma para obtener un aprovechamiento completo de la vía de salvamento mediada por FcRn.

En este intervalo de pH, solo los residuos de histidina y las cadenas laterales de aminoácidos con pKa perturbado tienen posibilidades de cambiar de estado de protonación. Si las cadenas laterales de aminoácidos realizan una contribución importante a la energía de unión del complejo, podría esperarse que un desplazamiento del pH de un extremo al otro en el intervalo produjera una reducción en la afinidad de unión del complejo. Sin querer estar limitado por ninguna teoría, esto produciría a su vez un aumento en la probabilidad de que el dAb específico de SA entrara en la vía de degradación más que ser rescatado por la vía de salvamento mediada por FcRn.

40 Así, para una unión a SA AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica), es deseable seleccionar una en la que la característica de unión a albúmina sérica no cambie significativamente con el pH (en el intervalo de 5,0 a 7,4). Un método sencillo de garantizarlo consistiría en analizar las secuencias de aminoácidos de los dAb anti-SA en cuanto a la ausencia de residuos de histidina en las CDR. Como se muestra más adelante, pueden contemplarse varios procedimientos de selección para dicha propiedad:

45 Por ejemplo, una primera tanda de selección se realiza con el repertorio de fagos de dAb 'nuevos' usando albúmina sérica humana inmovilizada en condiciones en las que el pH del tampón está en pH 7,4 (p. ej. PBS). A continuación se envía la población de fagos recuperada y amplificada a una segunda tanda de selección en la que el tampón de incubación está a un pH 5,0. La alternancia de tampones y pH se repite opcionalmente en tandas adicionales con el fin de mantener la presión de selección para la unión de dAb a HSA para los dos pH.

50 En un segundo ejemplo, todas las tandas de selección se realizan con el repertorio de fagos de dAb 'nuevos' usando albúmina sérica humana inmovilizada en condiciones en las que el pH del tampón es un pH 7,4 (p. ej. PBS). Sin embargo, justo después de lavar el fago no ligado con PBS (o PBS suplementado con Tween) y antes de la elución del fago ligado, se añade una etapa adicional de lavado/incubación a pH 5,0 durante un periodo de tiempo prolongado (p. ej. hasta 4 horas). Durante este periodo, los dAb de presentación de fagos que son incapaces de unirse a SA a pH 5,0 (pero capaces de unirse a pH 7,4) se desprenden de la SA inmovilizada. Tras una segunda

serie de etapas de lavado a pH 5,0 con(sin) Tween, se recupera y se analiza el fago ligado.

En un tercer ejemplo, todas las tandas de selección se realizan con el repertorio de fagos de dAb 'nuevo' usando albúmina sérica inmovilizada humana en condiciones en las que el pH del tampón es un pH 7,4 (p. ej. PBS). A continuación se identifican los mejores candidatos de dAb (es decir, capaces de unirse a pH 7,4 y pH 5,0) mediante cribado. Normalmente, los genes que codifican los dAb se recuperan del fago seleccionado de la reserva, subclonado en un vector de expresión que dirige el dAb soluble al sobrenadante de cultivos de E. coli. Los clones individuales se recogen, se cultivan por separado los pocillos de placas de microvaloración y se inducen para expresión. Los sobrenadantes (o dAb purificados) se cargan entonces directamente en un chip de Biacore para identificar los dAb que presentan afinidad por la albúmina sérica inmovilizada. Cada sobrenadante se criba para la unión (principalmente la de disociación del sensorgrama) con HSA en condiciones en que el tampón 'en curso' está a pH 7,4 o a pH 5,0. Debe observarse que el cribado de la unión a dAb en el Biacore se usaría también como un método preferido para identificar los mejores valores de los dos ejemplos anteriores.

En la presente memoria se describe un ligando que comprende un dominio variable individual como se define en la presente memoria, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica a un pH sérico natural y a un pH de vesícula intracelular. El pH sérico natural es de aproximadamente 7 (p. ej., 7,4), y en donde dicho pH de vesícula intracelular puede estar comprendido entre aproximadamente 4,8 y 5,2, o puede estar a un pH de aproximadamente 5. En una realización, el dominio variable individual puede unirse específicamente a albúmina sérica con un pH comprendido entre aproximadamente 7 y 5, o puede estar a un pH de 7,4. Sin querer estar limitado por ninguna teoría, una característica adicional de este ligando es que su dominio variable individual que se une específicamente a albúmina sérica no se disocia sustancialmente de la albúmina sérica mientras se somete a filtrado glomerular en el riñón. Sin querer estar limitado por ninguna teoría, una característica adicional de este ligando es que su dominio variable individual que se une específicamente a albúmina sérica no interfiere sustancialmente con la unión de FcRn a la albúmina sérica. Este dominio variable individual puede ser un dominio variable individual de anticuerpos; el dominio variable individual de anticuerpos puede ser un dominio VH3 y/o el dominio variable individual de anticuerpos puede ser un dominio V kappa. Este dominio variable individual puede comprender un armazón de no inmunoglobulinas, p. ej., armazones de CTLA-4, lipocalina, SpA, Affibody™, GroEL, Avímero™ o fibronectina, y puede contener una o más de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de un dominio variable individual de anticuerpos que preferiblemente, aunque no necesariamente, se une específicamente a albúmina sérica. El o los dominios variables individuales de este ligando, pueden unirse específicamente a albúmina sérica humana, y/o incluir albúmina sérica de una o más especies, p. ej., un hospedador humano, rata, mono, porcino, conejo, hámster, ratón o cabra. El compartimento intracelular puede ser cualquier compartimento intracelular de cualquier célula de cualquier animal, que incluye un compartimento endosómico o vesícula intracelular o una vesícula de gemación. El compartimento endosómico puede tener un pH de aproximadamente 5, o 5,0. Los ligandos descritos en la presente memoria pueden contener uno o más dominios variables individuales que incluyen inmunoglobulina y/o dominios no de inmunoglobulinas en que la unión de albúmina sérica al dominio variable individual no inhibe sustancialmente competitivamente la unión de FcRn a albúmina sérica. Estos uno o más dominios variables individuales pueden unirse preferiblemente específicamente a albúmina sérica con una constante de disociación de equilibrio (Kd) inferior o igual a 300 nM.

En la presente memoria se describe un método para seleccionar un ligando que comprende un dominio variable individual, que contiene un dominio variable individual (monómero), o más de un dominio variable individual (p. ej., multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica humana a un pH sérico natural, y en el que el dominio variable individual no inhibe competitivamente la unión de albúmina sérica humana a FcRn, y en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica humana a un pH de un compartimento intracelular, que comprende las etapas de: (A) selección de ligandos que comprenden un dominio variable individual que no se une a las regiones de albúmina sérica humana que se unen a FcRn, (B) a partir de los ligandos seleccionados en la etapa (A), selección de ligandos que comprenden un dominio variable individual que se une a albúmina sérica a dicho pH sérico natural. (C) selección de los ligandos seleccionados en la etapa (B) para los que se unen a albúmina sérica al pH de dicho compartimento intracelular. Alternativamente las etapas (A) y (B) pueden invertirse del modo siguiente: (A) selección de ligandos que comprenden un dominio variable individual que se une a albúmina sérica humana a dicho pH sérico natural, (B) a partir de los ligandos seleccionados en (A), selección de los ligandos que comprenden un dominio variable individual que se une a albúmina sérica humana fuera de las regiones de HSA que se unen FcRn, y (C) de los ligandos seleccionados en la etapa (B), selección de aquellos que se unen a albúmina sérica a dicho pH de dicho compartimento intracelular. También se describe un método para seleccionar un ligando que comprende un dominio variable individual, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica humana a un pH sérico natural, en donde el dominio variable individual no inhibe competitivamente la unión de albúmina sérica humana a FcRn, y en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica humana a un pH de un compartimento intracelular, que comprende las etapas de: (A) selección de ligandos que comprenden un dominio variable individual que no se une a las regiones de albúmina sérica humana que se unen a FcRn, (B) a partir de la etapa (A) selección de ligandos que comprenden un dominio variable individual que se une a albúmina sérica a dicho pH sérico natural, y (C) modificación genética del dominio variable individual de la etapa (B) de manera que se une a albúmina sérica a dicho pH de dicho compartimento intracelular. Alternativamente las etapas

(A) y (B) pueden invertirse del modo siguiente: (A) selección de ligandos que comprenden un dominio variable individual que se une a albúmina sérica a dicho pH sérico natural, (B) a partir de los ligandos seleccionados en (A), selección de los ligandos que comprenden un dominio variable individual que no se une a las regiones de albúmina sérica humana que se unen a FcRn, y (C) modificación genética del dominio variable individual de la etapa (B) de manera que se une a albúmina sérica a dicho pH de dicho compartimento intracelular.

Ensayo para determinar si un dominio variable individual no inhibe competitivamente la unión de albúmina sérica humana a FcRn: puede usarse un experimento de competencia Biacore para determinar si un dominio variable individual inhibe competitivamente la unión de albúmina sérica a un FcRn. Un protocolo experimental para dicho ejemplo es el siguiente. Después de recubrir un chip sensor CM5 (Biacore AB) a 25 °C con aproximadamente 1.100 unidades de resonancia (RU) de una FcRn purificada a pH 7,4, se inyecta albúmina sérica humana (HSA) sobre la superficie del antígeno en una única concentración (p. ej., 1 µM) en solitario, y en combinación con una serie de dilución de mezclas, teniendo cada mezcla HSA y cantidades crecientes del dominio variable individual en cuestión. Las RU de la unión resultante se determinan para la HSA en solitario y cada una de las mezclas de HSA/dominio variable individual. Comparando las RU unidas de HSA en solitario con las RU unidas de HSA + dominio variable individual, podrá verse si FcRn compite con el dominio variable individual para unirse a HSA. Si compite, entonces cuando se incrementa la concentración de dominio variable individual en solución, las RU de HSA unida a FcRn disminuirán. Si no existe competencia, añadir el dominio variable individual no tendrá influencia en el modo en que se une la HSA a FcRn. Este ensayo de competencia puede repetirse opcionalmente a pH 5,0 para un dominio variable individual que se une a HSA a pH 5,0 con el fin de determinar si el dominio variable individual inhibe competitivamente la unión de albúmina sérica a FcRn para pH 5,0.

Estos ligandos que tienen un dominio variable individual, que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (p. ej., multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica a un pH sérico natural y a un pH de vesícula intracelular, puede comprender además al menos un dominio variable individual adicional, en el que cada dominio variable individual adicional se une específicamente a un antígeno distinto de albúmina sérica a un pH sérico natural, pero no se une al antígeno a un pH de vesícula intracelular. El pH sérico natural es de aproximadamente 7,4, y el pH de dicha vesícula intracelular está comprendido entre aproximadamente 4,8 y 5,2, y en algunas realizaciones, el pH de dicha vesícula intracelular es aproximadamente 5.

Un método basado en las ideas anteriores incluye el uso de un ligante biespecífico con afinidad por una albúmina sérica para prolongar la semivida y una afinidad a un antígeno diana deseado, como se describió anteriormente, para dirigir un antígeno unido para degradación, o reciclado. Como se describió anteriormente, se selecciona una unión a un resto de albúmina sérica, de manera que la unión es de alta afinidad a pH 5,0, de manera que la molécula se clasificaría para no degradación en el endosoma por un proceso mediado por FcRn. A continuación se selecciona un resto de unión a antígeno diana deseado usando una técnica similar a la que se describió anteriormente, con la salvedad de que, en lugar de seleccionar unión de alta afinidad a pH 7,4 y pH 5 como se describió anteriormente, se realiza selección para unión de alta afinidad a pH 7,4, y afinidad baja o nula para el antígeno diana a pH 5. Una forma de conseguirlo consiste en seleccionar restos con histidinas en la superficie de contacto. Una proteína de fusión entre las 2 moléculas se realiza principalmente por técnicas convencionales de molecular biología, ya sea por derivación y reticulación química, o por fusión genética. El resultado es un aumento en la potencia de un AlbuAb™ dado (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) in vivo, diseñando un dAb de unión a SA que se une a SA a pH 5, a la vez que tiene un dAb partícipe que se une a un ligando, que tiene una afinidad baja o nula a pH 5. Sin querer estar limitado por ninguna teoría, tras el reciclado endosómico, la molécula diana se liberará, y se dirigirá a un endosoma de degradación y se degradará, mientras que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) se recicla para unirse a un ligando nuevo por reciclado mediado por FcRn. Este método ofrece una ventaja fundamental con respecto a las moléculas PEGiladas u otras tecnologías de extensión de la semivida, en las que esta vía no está disponible para regeneración. Presumiblemente en estos casos, el ligando unido se asienta simplemente en el resto PEGilado y lo ocupa.

En la presente memoria se describe un método para dirigir un antígeno para degradación que comprende la administración de un ligando que tiene al menos un dominio variable individual, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica a un pH sérico natural y a un pH de vesícula intracelular, y que tiene además al menos un dominio variable individual adicional, en donde el dominio variable individual se une específicamente a un antígeno distinto de albúmina sérica a un pH sérico natural, pero no se une a dicho antígeno a un pH de vesícula intracelular, dirigiendo así el antígeno distinto de albúmina sérica para degradación. En la presente memoria se describe también un ligando que comprende además al menos un dominio variable individual adicional, en donde dicho dominio variable individual se une específicamente a un antígeno distinto de albúmina sérica a un pH sérico natural, pero no se une a dicho antígeno a un pH de vesícula intracelular.

Selección de dAb in vitro en presencia de metabolitos

En los ligandos descritos en la presente memoria está comprendido un ligando que comprende un dominio variable individual, que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (p. ej., multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que

está unido específicamente a albúmina sérica, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica humana, y en el que la unión específica de albúmina sérica por el dominio variable individual no se bloquea esencialmente por unión de fármacos y/o metabolitos y/o moléculas pequeñas a uno o más sitios en albúmina sérica. El uno o más sitios en albúmina sérica humana incluyen sitio Sudlow 1 y sitio Sudlow 2. El uno o más sitios pueden estar situados en cualquier combinación de uno o más dominios de albúmina sérica humana seleccionados entre el grupo que consiste en dominio I, dominio II y dominio III.

En los ligandos descritos en la presente memoria está comprendido un ligando que comprende un dominio variable individual, que contiene un dominio variable individual (monómero) o más de un dominio variable individual (p. ej., multímero, proteína de fusión, conjugado y ligando específico doble como se define en la presente memoria) que está unido específicamente a albúmina sérica, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica humana, y en el que la unión específica de albúmina sérica por dicho dominio variable individual no altera las características de unión de albúmina sérica para fármacos y/o metabolitos y/o moléculas pequeñas unidos a SA. En una realización el dominio variable individual del ligando se une a albúmina sérica en presencia y/o ausencia de un fármaco, metabolito u otra molécula pequeña. Y en otra realización, la unión específica de albúmina sérica por dicho dominio variable individual no altera sustancialmente las características de unión de albúmina sérica para fármacos y/o metabolitos y/o moléculas pequeñas unidos a SA naturalmente in vivo, lo que incluye, pero preferiblemente no se limita a los fármacos y/o metabolitos y/o moléculas pequeñas descritos en Fasano *et al.* (2005) 57(12):787-96. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, y Bertucci, C. *et al.* (2002) 9(15):1463-81, Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance.

Los fármacos y/o metabolitos y/o moléculas pequeñas unidos a SA pueden o no superponerse a los fármacos y/o metabolitos y/o moléculas pequeñas que no inhiben sustancialmente ni compiten con albúmina sérica por la unión al dominio variable individual. Los fármacos y/o metabolitos incluyen, pero preferiblemente no se limitan a warfarina, ibuprofeno, vitamina B6, bilirrubina theta, hemina, tiroxina, ácidos grasos, acetaldehído, metabolitos de ácidos grasos, glucurónido de acilo, metabolitos de bilirrubina, halotano, salicilato, benzodapenos y 1-O-gemfibrocil-B-D-glucurónido. Esta inhibición o competencia con albúmina sérica para la unión al dominio variable individual por moléculas pequeñas puede ocurrir tanto por desplazamiento directo como por efectos alostéricos como se describe para los cambios inducidos por la unión molécula pequeña en la unión de otras moléculas pequeñas, véase Ascenzi *et al.* (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6(4):483-9. Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin, y Ghuman J. *et al.* (2005) J. Mol. Biol. 353(1):38-52 Structural basis of the drug-binding to human serum albumin. En una realización la molécula pequeña, ya sea en solitario o en concierto con una o más de otras moléculas pequeñas, y/o metabolitos, y/o proteínas y/o fármacos, se une a albúmina sérica. En otra realización, la molécula pequeña ya sea en solitario o en concierto con una o más de otras moléculas pequeñas, y/o metabolitos, y/o proteínas y/o fármacos, no inhibe ni compite sustancialmente con albúmina sérica para la unión al dominio variable individual. En otra realización, la molécula pequeña, ya sea en solitario o en concierto con una o más de otras moléculas pequeñas, y/o metabolitos, y/o proteínas y/o fármacos, inhibe o compite sustancialmente con albúmina sérica para la unión al dominio variable individual.

El dominio variable individual puede ser un dominio variable individual de anticuerpos. El dominio variable individual de anticuerpos puede ser un dominio VH3. El dominio variable individual de anticuerpos puede ser un dominio V kappa. El dominio variable individual puede comprender uno o más armazones de no inmunoglobulinas. El armazón de no inmunoglobulinas puede incluir uno o más de, pero preferiblemente no se limita a, CTLA-4, lipocalina, SpA, GroEL y fibronectina, e incluye un Affibody™ y un Avímero™.

En la presente memoria se describe un método de selección de un dominio variable individual que se une a albúmina sérica, que comprende la selección de un primer dominio variable por su capacidad de unirse a la albúmina sérica en presencia de uno o más metabolitos y/o fármacos, en el que la selección se realiza en presencia del uno o más metabolitos y/o fármacos. En la presente memoria se describe también un método para producir un ligando específico doble que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulinas que tiene una primera especificidad de unión para albúmina sérica en presencia de un metabolito y/o fármaco, y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulinas que tiene una segunda especificidad de unión, comprendiendo el método las etapas de: (a) selección de un primer dominio variable por su capacidad de unirse a un primer epítipo en presencia de uno o más metabolitos y/o fármacos, (b) selección de un segundo dominio variable por su capacidad de unirse a un segundo epítipo, (c) combinación de los dominios variables; y (d) selección del ligando por su capacidad de unirse a albúmina sérica en presencia de dichos uno o más metabolitos y/o ligandos y dichos segundos epítopos. Este método puede incluir también una etapa en la que el primer dominio variable se selecciona para la unión a dicho primer epítipo en ausencia de un dominio variable complementario, y/o en el que el primer dominio variable se selecciona para la unión a dicho primer epítipo en presencia de un tercer dominio variable complementario en el que dicho tercer dominio variable es diferente de dicho segundo dominio variable. Estas etapas de selección pueden realizarse en presencia de una mezcla de metabolitos y/o fármacos y/o proteínas y/o moléculas pequeñas. Las etapas de selección pueden realizarse también del modo siguiente: (a) selección de dominios variables individuales que se unen a albúmina sérica en presencia de un primer metabolito y/o fármaco y/o molécula pequeña; y (b) a partir de los dominios seleccionados en la etapa (a), se selecciona un dominio en presencia de un segundo metabolito y/o fármaco y/o molécula pequeña. También se comprende un método para producir un ligando específico doble que tiene un primer dominio variable individual de inmunoglobulinas que tiene

una primera especificidad de unión para albúmina sérica en presencia de uno de entre metabolito y/o fármaco y/o molécula pequeña, y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulinas que tiene una segunda especificidad de unión, teniendo el método las etapas de: (a) selección de primeros dominios variables por su capacidad de unirse a albúmina sérica en presencia de uno o más metabolitos y/o fármacos y/o moléculas pequeñas, (b) selección de segundos dominios variables por su capacidad de unirse a un epítipo, (c) combinación de los dominios variables para proporcionar ligandos que comprenden un primer y un segundo dominio variable; y (d) a partir de los ligandos proporcionados por la etapa (c), y selección de un ligando por su capacidad de unirse a albúmina sérica en presencia del uno o más metabolitos y/o fármacos y su capacidad de unirse a dichos epítopos, produciendo así un ligando específico doble. En una realización, el primer dominio variable se selecciona para la unión a albúmina sérica en ausencia de un dominio variable complementario. En otra realización, el primer dominio variable se selecciona para la unión al primer epítipo en presencia de un dominio variable complementario en que el dominio variable complementario es diferente del segundo dominio variable.

En la presente memoria se describe un ligando que comprende un dominio variable individual, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica *in vitro* a pH 7 y a un pH del compartimento intracelular, y en el que el dominio variable individual es un dominio variable individual de ocurrencia no natural. En la presente memoria se describe también un ligando que comprende un dominio variable individual de anticuerpos, en el que el dominio variable individual de anticuerpos se une específicamente a albúmina sérica *in vitro* a pH 7 y a un pH del compartimento intracelular. En una realización el pH del compartimento intracelular está comprendido entre 4,8 y 5,2. En otra realización, la unión de albúmina sérica al dominio variable individual de anticuerpos no inhibe sustancialmente la unión de FcRn a la albúmina sérica, como se determina mediante un ensayo de competencia de resonancia por plasmones superficiales *in vitro*.

En otra realización, el dominio variable individual de anticuerpos comprende una o más regiones CDR de anticuerpos seleccionadas del grupo que consiste en: CDR1, CDR2 y CDR3. En otra realización, el dominio variable individual de anticuerpos comprende un armazón seleccionado del grupo que consiste en: CTLA-4, lipocalina, proteína estafilocócica A (SpA), GroEL, GroES, transferrina y fibronectina. La unión de albúmina sérica al dominio variable individual no compite sustancialmente con la unión de FcRn a albúmina sérica en una realización, y en otra realización el dominio variable individual de anticuerpos se une específicamente a albúmina sérica con una constante de disociación de equilibrio (Kd) inferior o igual a 300 nM.

En otra realización, el dominio variable individual de anticuerpos comprende además al menos un dominio variable individual adicional de anticuerpos, en el que el dominio variable individual adicional de anticuerpos se une específicamente a un antígeno distinto de albúmina sérica a pH 7, pero no se une al antígeno al pH del compartimento intracelular. En la presente memoria se describe también un método de direccionamiento de un antígeno para la degradación en una persona que comprende la administración de un ligando que comprende un dominio variable individual, como un dominio variable individual de anticuerpos, que se une específicamente a albúmina sérica *in vitro* a pH 7 y a un pH del compartimento intracelular, para el individuo, comprendiendo el ligando además al menos un dominio variable individual adicional de anticuerpos que comprende un dominio variable individual, p. ej., un dominio variable individual de anticuerpos, en el que el antígeno distinto de albúmina sérica es el antígeno direccionado para degradación.

En una realización de los ligandos de la invención, la unión específica de albúmina sérica humana por el dominio variable individual de anticuerpos no se bloquea por la unión de un fármaco y/o un metabolito y/o una molécula pequeña predeterminados a uno o más sitios en la albúmina sérica humana. En estas realizaciones, el dominio variable individual adicional de anticuerpos puede ser un dominio variable individual de cadena pesada de anticuerpos o un dominio variable individual de cadena ligera de anticuerpos que comprende una o más CDR de anticuerpos seleccionadas del grupo que consiste en: CDR1, CDR2 y/o CDR3. Los dominios variables individuales pueden comprender un armazón seleccionado del grupo que consiste en: CTLA-4, lipocalina, proteína estafilocócica A (SpA), GroEL, GroES, transferrina y fibronectina.

Otra realización de un ligando descrita en la presente memoria es un ligando que comprende un dominio variable individual, en el que el dominio variable individual es un dominio variable individual de ocurrencia no natural, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica humana *in vitro* a pH 7 y a un pH del compartimento intracelular, en el que la unión específica de albúmina sérica humana por el dominio variable individual no es bloqueada por la unión de un fármaco y/o un metabolito y/o una molécula pequeña predeterminado a uno o más sitios en la albúmina sérica humana, en el que el uno o más sitios en albúmina sérica humana incluyen sitio Sudlow 1 y sitio Sudlow 2 o el uno o más sitios están situados en uno o más dominios de albúmina sérica humana seleccionados del grupo que consiste en: dominio I, dominio II y dominio III.

55 Grupos enlazadores

La conexión de un AlbuAbTM (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) (anticuerpo de dominio de anti-albúmina sérica o dominio variable individual) con otro resto biológicamente activo puede obtenerse por medio de técnicas de ingeniería recombinante. Básicamente, los genes que codifican las dos proteínas de interés se fusionan en el marco. Pueden considerarse varios formatos en los que el anticuerpo del dominio de albúmina sérica está en el extremo N de la fusión (es decir AlbuAbTM-Y en el que Y es un polipéptido biológicamente activo), en el

extremo C de la fusión (es decir Z-AlbudAb™ en el que Z es un péptido biológicamente activo). En algunos casos, se puede considerar la fusión de más de un polipéptido biológicamente activo en un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica), de lo que se obtiene una serie de posibilidades relativas al diseño de la fusión. Por ejemplo, la fusión podría ser la siguiente: Z-Y-AlbuAb™, Z-AlbuAb™-Y o AlbuAb™-Z-Y.

5 En todas estas moléculas de fusión, dos polipéptidos están unidos covalentemente por medio de al menos un enlace peptídico. En su enfoque más simple, el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) y el o los polipéptidos biológicamente están unidos directamente. Así, la unión entre el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) y el polipéptido sería la siguiente:

a) Para un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) en el extremo C,

10 En el que el AlbuAb™ es un VK:-

xxxDIQ

xxxNIQ

xxxAIQ

xxxAIR

15 xxxVIW

xxxDIV

xxxDVV

xxxEIV

xxxETT

20 En el que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) es un Vλ:-

xxxQSV

xxxQSA

xxxSYE

xxxSSE

25 xxxSYV

xxxLPV

xxxQPV

xxxQLV

xxxQAV

30 xxxNFM

xxxQTV

xxxQAG

En el que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) es un VH (p. ej., VH humano):-

xxxQVQ

35 xxxQMQ

xxxEVQ

xxxQIT

xxxQVT

xxxQLQ

En el que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) es un VHH (p. ej., dominio variable de cadena pesada de camélido):-

xxxEVQ

xxxQVQ

5 xxxDVQ

xxxQVK

xxxAVQ

b) Para un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) en el extremo N,

En el que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) es un VK:-

10 KVEIKxxx

KLEIKxxx

KVDIKxxx

RLEIKxxx

EIKRxxx

15 En el que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) es un VA:-

KVDVLxxx

KLDVLxxx

QLDVLxxx

En el que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) es un VH (p. ej., human VH):-

20 VTVSSxxx

En el que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) es un VHH (p. ej., dominio variable de cadena pesada de camélido):-

VTVSSxxx

'xxx' representa los tres primeros o los tres últimos aminoácidos del (primer) polipéptido biológicamente activo fusionado con el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica).

30 Sin embargo, pueden darse casos en los que la producción de una proteína de fusión recombinante que recupera la actividad funcionales de los dos polipéptidos puede facilitarse por la conexión a los genes codificantes con un segmento de ADN de puente que codifica un grupo enlazador peptídico que se divide entre los polipéptidos conectados en tándem. La longitud óptima del grupo enlazador peptídico se idea normalmente de forma empírica: puede ser muy breve como un aminoácido o extenderse hasta 50 aminoácidos. Se han propuesto grupos enlazadores de diferentes diseños y son bien conocidos en la técnica. Se entiende que los siguientes ejemplos proporcionan una lista extensa, aunque no exhaustiva, de los posibles enfoques de grupos enlazadores:

1. Grupos enlazadores flexibles:

35 Los grupos enlazadores flexibles están diseñados para adoptar una estructura secundaria no estable cuando se conectan dos restos de polipéptidos, permitiendo así un intervalo de conformaciones en la proteína de fusión. Estos grupos enlazadores son preferiblemente hidrófilos por naturaleza para prevenir que interaccionen con uno o los dos polipéptidos fusionados. Normalmente en estos grupos enlazadores dominan los pequeños residuos polares como glicina y serina en los grupos enlazadores con el fin de incrementar las características flexibles e hidrófilas de la estructura principal del péptido, respectivamente. La longitud de estos grupos enlazadores es variable y se determina mejor empíricamente o con ayuda de estrategias de cálculo 3D. En general, una longitud preferida de grupo enlazador será la mínima compatible con una buena expresión, buena solubilidad y recuperación plena de las funciones y estructuras nativas de interés. Debido a sus características flexibles, los grupos enlazadores flexibles pueden constituir buenos sustratos para proteasas endógenas. En general, salvo que sea una característica deseable los grupos enlazadores flexibles están desprovistos de aminoácidos como aminoácidos cargados o grandes hidrófobos/aromáticos que se reconocen de forma eficaz mediante proteasas endógenas con una amplia especificidad de sustrato. Además los residuos de cisteína preferiblemente se evitan ya que las cisteínas libres

pueden reaccionar entre sí para formar cisteínas, de lo cual se produce (i) la formación de puentes entre dos proteínas de fusión por medio de los grupos enlazadores, y/o (ii) el compromiso de la expresión/plegamiento de la proteína de fusión si uno o más de los polipéptidos bioactivos comprenden uno o más residuos de cisteína ('aleatorización de cisteína').

- 5 Los ejemplos de grupos enlazadores flexibles son: (i) grupos enlazadores ricos en glicina basados en la repetición de un motivo (GGGS)y en el que y es al menos 1, aunque y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, o más (véase publicaciones internacionales PCT n° EP 0 753 551, US 5 258 498, EP 0 623 679), (ii) grupos enlazadores ricos en serina basados en la repetición de un motivo (SSSSG)y en el que y es al menos 1, aunque y puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, o más (véase publicaciones internacionales PCT n°: EP 0 573 551, US 5 525 491).

10 2. Grupos enlazadores restringidos:

Los grupos enlazadores restringidos se diseñan para adoptar una estructura secundaria estable cuando se conectan dos restos de polipéptidos, restringiendo así el intervalo de conformaciones en la proteína de fusión. Dichos grupos enlazadores adoptan normalmente una estructura helicoidal que se extiende varias vueltas. De nuevo, la longitud de estos grupos enlazadores es variable y se determina mejor empíricamente o con la ayuda de estrategias de cálculo.

- 15 El principal motivo para elegir grupos enlazadores restringidos es mantener la máxima distancia entre cada polipéptido de la fusión. Este hecho es especialmente relevante cuando los dos polipéptidos tienen tendencia a formar heteroagregados. Debido a su estructura, los grupos enlazadores restringidos pueden ser también más resistentes a la degradación proteolítica, con lo que ofrecen una ventaja cuando se inyectan *in vivo*.

Los ejemplos de grupos enlazadores restringidos se citan en las publicaciones internacionales PCT n° WO-00/24884 (p. ej. SSSASASSA, GSPGSPG, o ATTTGSSPGPT), US 6.132.992 (p. ej. grupos enlazadores peptídicos helicoidales).

3. Grupos enlazadores 'naturales':

- Los grupos enlazadores naturales son secuencias polipeptídicas (de longitudes variables) que, por oposición, no son sintéticas, es decir, las secuencias polipeptídicas que componen los grupos enlazadores están presentes en la naturaleza. Los grupos enlazadores naturales pueden ser flexibles o restringidos y pueden ser muy diversos en secuencia de aminoácidos y composición. Su grado de resistencia a la proteólisis depende de las proteínas de origen y del entorno biológico al que estas proteínas se exponen en la naturaleza (extracelular, intracelular, procariota, eucariota, etc.). Una clase de grupos enlazadores es especialmente relevante para el desarrollo de productos terapéuticos biológicos en el ser humano: grupos enlazadores basados en péptidos presentes en proteínas humanas. De hecho estos grupos enlazadores son por naturaleza no inmunógenos, o lo son muy débilmente, y por tanto potencialmente más seguros para la terapia humana.

- Los ejemplos de grupos enlazadores naturales son: (i) KESGSVSSEQLAQFRSLD (véase Bird *et al.* (1988) Science, 242, 423-426), (ii) secuencias que corresponden al dominio bisagra de inmunoglobulinas desprovistas de cadenas ligeras (véase Hamers-Casterman *et al.* (1993) Nature, 363, 446-448 y publicación internacional PCT n°: WO-096/34103). Los ejemplos de grupos enlazadores para su uso con anticuerpos de dominio de anti-albúmina (p. ej., anticuerpos de dominios VHH humanos, humanizados, humanos con camélidos o VHH de camélidos) son EPKIPQPQPKPQPKPQPKPQKPEPECTCPKCP y GTNEVCKCPKCP. Otros grupos enlazadores obtenidos de bisagras humanas y de camélidos se describen en el documento EP0656946, incorporado en la presente memoria como referencia. Los grupos enlazadores derivados de bisagras pueden tener longitudes variables, por ejemplo de 0 a aproximadamente 50 aminoácidos, lo que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 11, 12,13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 aminoácidos.

- Como se emplea en la presente memoria, "fármaco" se refiere a cualquier compuesto (p. ej., molécula orgánica pequeña, ácido nucleico, polipéptido) que puede administrarse a un individuo para producir un efecto beneficioso, terapéutico o diagnóstico, a través de la unión a y/o la alteración de la función de una molécula diana biológica en el individuo. La molécula diana puede ser una molécula diana endógena codificada por el genoma del individuo (p. ej. una enzima, receptor, factor de crecimiento, citocina codificada por el genoma del individuo) o una molécula diana exógena codificada por el genoma de un patógeno (p. ej. una enzima codificada por el genoma de un virus, bacteria, hongo, nematodo u otro patógeno).

- 50 La composición del fármaco puede ser un conjugado en donde el fármaco está unido covalente o no covalentemente al resto de unión a polipéptidos. El fármaco puede estar unido covalente o no covalentemente al resto de unión a polipéptidos directa o indirectamente (p. ej., a través de un grupo enlazador adecuado y/o la unión no covalente de partícipes de unión complementarios (p. ej., biotina y avidina)). Cuando se emplean partícipes de unión complementarios, uno de los partícipes de unión puede estar unido covalentemente al fármaco directamente o a través de un resto del grupo enlazador adecuado, y el partícipe de unión complementario puede estar unido covalentemente al resto de unión a polipéptidos directamente o a través de un resto de grupo enlazador adecuado. Cuando el fármaco es un polipéptido o péptido, la composición del fármaco puede ser una proteína de fusión, en donde el polipéptido o péptido, el fármaco y el resto de unión a polipéptidos son partes discretas (restos) de una

cadena de polipéptidos continua. Como se describe en la presente memoria, los restos de unión a polipéptidos y restos de fármacos de polipéptidos pueden estar unidos directamente entre sí a través de un enlace peptídico, o ligado a través de un aminoácido, o péptido o grupo enlazador polipeptídico adecuado.

Disminución de la inmunogenicidad

- 5 En la presente memoria se describe un método para reducir la inmunogenicidad de un agente farmacéutico, que comprende la modificación de dicho agente de manera que el agente contiene además una región de un dominio variable individual, en la que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica *in vivo* y/o *ex vivo*, y en la que el agente puede incluir un fármaco, un metabolito, un ligando, un antígeno y una proteína. La albúmina sérica puede ser albúmina sérica humana. El dominio variable individual puede ser un dominio variable individual de inmunoglobulinas. El dominio variable individual de inmunoglobulinas puede ser un dominio variable individual VH de anticuerpos. El dominio variable individual VH puede ser un dominio variable individual VH3. El dominio variable individual VH3 puede ser un dominio variable individual VH3 humano. El dominio variable individual puede ser un dominio variable individual $V\kappa$ o $V\lambda$ de anticuerpos. El dominio variable individual de anticuerpos puede comprender un conjunto de cuatro regiones marco Kabat (FR que están codificadas por segmentos génicos de anticuerpos de línea germinal de marco VH3). El marco VH3 se selecciona entre el grupo que consiste en DP47, DP38 y DP45. El dominio variable individual de anticuerpos puede contener un conjunto de cuatro regiones marco Kabat (FR), que están codificadas por segmentos génicos de anticuerpos de línea germinal de marco $V\kappa$. Un ejemplo no limitativo de un marco κ es DPK9. El dominio variable individual puede contener un armazón de inmunoglobulinas o de no inmunoglobulinas que contiene regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3, en donde al menos una de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 es de un dominio variable de anticuerpos que se une específicamente a albúmina sérica. El armazón de no inmunoglobulinas puede incluir, pero preferiblemente no se limita a, CTLA-4, lipocalina, SpA, Affibody™, GroEL, Avímeros™ y fibronectina. La albúmina sérica puede ser albúmina sérica humana. El dominio variable individual de inmunoglobulinas y/o el dominio variable individual de no inmunoglobulinas puede unirse específicamente a albúmina sérica humana con una Kd de menos de 300 nM. El dominio variable individual de inmunoglobulinas y/o el dominio variable individual de no inmunoglobulinas puede unirse específicamente a albúmina sérica humana y una o más albúminas séricas no humanas, con valores de Kd en los límites de un factor de 10 entre sí. El dominio variable individual de inmunoglobulinas y/o el dominio variable individual de no inmunoglobulinas puede unirse específicamente a albúmina sérica humana y a una o más albúminas séricas no humanas, y en donde la semividada beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semividada beta T de albúmina sérica humana en un hospedador humano. Además, el dominio variable individual de inmunoglobulinas y/o el dominio variable individual de no inmunoglobulinas puede unirse específicamente al Dominio II de albúmina sérica humana. El dominio variable individual de inmunoglobulinas y/o el dominio variable individual de no inmunoglobulinas pueden unirse específicamente a albúmina sérica a un pH sérico natural y a un pH de vesícula intracelular. La unión específica de albúmina sérica por dicho dominio variable individual de inmunoglobulinas y/o dominio variable individual de no inmunoglobulinas preferiblemente no es bloqueado sustancialmente por la unión a fármacos y/o metabolitos a uno o más sitios en la albúmina sérica. En una realización, la unión específica de albúmina sérica por el dominio variable individual no altera las características de unión de albúmina sérica para fármacos y/o metabolitos y/o moléculas pequeñas unidos a SA. En una realización el método para modificar el agente produce la formación de un agente modificado que tiene una fórmula que comprende: $a-(X)n_1-b-(Y)n_2-c-(Z)n_3-d$ o $a-(Z)n_3-b-(Y)n_2-c-(X)n_1-d$, en donde X es un fármaco polipeptídico que tiene especificidad de unión para una primera diana; Y es un dominio variable individual, p. ej. un dominio variable individual de anticuerpos que se une específicamente a albúmina sérica *in vivo* y/o *ex vivo*; Z es un fármaco polipeptídico que tiene especificidad de unión para una segunda diana; a, b, c y d son independientemente un polipéptido que comprende de uno a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos o está ausente; n_1 es de uno a aproximadamente 10; n_2 es de uno a aproximadamente 10; y n_3 es de cero a aproximadamente 10. En una realización adicional, cuando n_1 y n_2 son uno y n_3 es cero, X no comprende ninguna cadena de anticuerpos o ningún fragmento de cadena de anticuerpos.

- En la presente memoria se describe un método para reducir la inmunogenicidad de un agente farmacéutico, que comprende la modificación del agente de manera que el agente comprende además un dominio variable individual, en el que el dominio variable individual se une específicamente a albúmina sérica, en el que el dominio variable individual es un dominio variable individual de ocurrencia no natural, y en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en: un fármaco, un metabolito, un ligando, un antígeno y una proteína. En la presente memoria se describe también un método para reducir la inmunogenicidad de un agente farmacéutico, que comprende la modificación del agente de manera que el agente comprende además un dominio variable individual de anticuerpos, en el que el dominio variable individual de anticuerpos se une específicamente a albúmina sérica, y en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en: un fármaco, un metabolito, un ligando, un antígeno y una proteína. En una realización, el dominio variable individual de anticuerpos es un dominio variable individual de cadena pesada de anticuerpos, p. ej., dominio variable individual VH3 de anticuerpos, o un dominio variable individual VH3 de anticuerpos humanos. En otra realización, el dominio variable individual de anticuerpos es un dominio variable individual de cadena ligera de anticuerpos, p. ej., un dominio variable individual $V\kappa$ de anticuerpos o $V\lambda$ de anticuerpos. En una realización, el dominio variable individual de anticuerpos comprende regiones CDR1, CDR2 y CDR3, en el que al menos una de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 es de un dominio variable de anticuerpos que se une específicamente a albúmina sérica, y opcionalmente comprende además un armazón seleccionado del

grupo que consiste en: CTLA-4, lipocalina, proteína estafilocócica A (SpA), GroEL, GroES, transferrina y fibronectina. En otra realización de estos métodos, el dominio variable individual, p. ej., el dominio variable individual de anticuerpos está unido específicamente a albúmina sérica humana con una Kd de menos de 300 nM, y en otra realización de estos métodos, el dominio variable individual, p. ej., el dominio variable individual de anticuerpos, está unido específicamente a albúmina sérica humana y una o más albúminas séricas no humanas, con valores de Kd en los límites de un factor de 10 entre sí. En otra realización de estos métodos, el dominio variable individual, p. ej., el dominio variable individual de anticuerpos, está unido específicamente a albúmina sérica humana y a albúmina sérica no humana, y la semivida beta T del ligando es sustancialmente la misma que la semivida beta T de albúmina sérica humana en un hospedador humano. En otra realización de estos métodos, el dominio variable individual, p. ej., el dominio variable individual de anticuerpos, está unido específicamente a un dominio II de albúmina sérica humana. En otra realización de estos métodos, el dominio variable individual, p. ej., el dominio variable individual de anticuerpos, se une específicamente a albúmina sérica a un pH 7 y a un pH del compartimento intracelular.

La invención se describe además, solo con fines de ilustración, en los ejemplos siguientes. Como se emplea en la presente memoria, para los fines de nomenclatura de los dAb, el receptor de TNF α humano se refiere como TAR1 y el receptor de TNF α humano 1 (receptor p55) se refiere como TAR2.

Ejemplo 9.

Selección de una colección de dominios individuales de anticuerpos (dAb) dirigidos frente a albúmina sérica humana (HSA) y albúmina sérica de ratón (MSA).

Este ejemplo explica un método para preparar un anticuerpo de dominio individual (dAb) dirigido frente a albúmina sérica. Se describe la selección de dAb frente a albúmina sérica de ratón (MSA) y albúmina sérica humana (HSA). En este experimento se usaron tres bibliotecas de presentación de fagos anticuerpo humanas, cada una basada en un marco humano individual para V_H (véase Figura 13: secuencia de V_H de entrenamiento basada en V3-23/DP47 y JH4b) o V_K (véase Figura 15: secuencia de V_K de entrenamiento basada en o12/o2/DPK9 y Jk1) con diversidad de cadenas laterales codificadas por codones NNK incorporados en regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3).

Biblioteca 1 (V_H):

Diversidad en las posiciones: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98.

Tamaño de biblioteca: 6,2 x 10⁹

Biblioteca 2 (V_H):

Diversidad en las posiciones: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98, H99, H100, H100a, H100b.

Tamaño de biblioteca: 4,3 x 10⁹

Biblioteca 3 (V_K):

Diversidad en las posiciones: L30, L31, L32, L34, L50, L53, L91, L92, L93, L94, L96

Tamaño de biblioteca: 2 x 10⁹

Las bibliotecas V_H y V_K se han preseleccionado para la unión a proteína A y proteína L de ligandos genéricos respectivamente de manera que la mayoría de los clones en las bibliotecas no seleccionadas son funcionales. Los tamaños de las bibliotecas mostrados anteriormente corresponden a los tamaños después de la preselección.

Se realizaron dos tandas de selección en albúmina sérica usando cada una de las bibliotecas por separado. Para cada selección, el antígeno se revistió sobre un inmunotubo (nunc) en 4 ml de PBS a una concentración de 100 μ g/ml. En la primera tanda de selección, cada una de las tres bibliotecas se analizó por separado en relación con HSA (Sigma) y MSA (Sigma). En la segunda tanda de selección, se analizó un fago de cada una de las seis selecciones de la primera tanda en relación con (i) de nuevo el mismo antígeno (p. ej. MSA de 1^a tanda, MSA de 2^a tanda) y (ii) en relación con el antígeno recíproco (p. ej. MSA de 1^a tanda, HSA de 2^a tanda) para producir un total de doce selecciones de la 2^a tanda. En cada case, después de la segunda tanda de selección se sometieron a ensayo 48 clones en cuanto a la unión a HSA y MSA. Se produjeron fragmentos de dAb solubles como se describe para el fragmento scFv en Harrison *et al.*, Methods Enzymol. 1996; 267:83-109 y se siguió el protocolo ELISA estándar (Hoogenboom *et al.* (1991) Nucleic Acid Res., 19: 4133) con la salvedad de que se empleó PBS Tween al 2 % como tampón de bloqueo y los dAb unidos se detectaron con proteína L-HRP (Sigma) (para V_K) y proteína A-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (para V_H).

Los dAb que produjeron una señal por encima del fondo que indica unión a MSA, HSA o a ambas se sometieron a ensayo en forma insoluble de ELISA para la unión a plástico en solitario pero todos fueron específicos de albúmina sérica. A continuación se secuenciaron los clones (véase Tabla 5) lo que puso de relieve que se habían identificado

ES 2 629 353 T3

21 secuencias de dAb singulares. La semejanza mínima (en el nivel de los aminoácidos) entre los clones de dAb de V_κ seleccionados fue del 86,25 % ((69/80) x 100; el resultado cuando todos los residuos diversificados son diferentes, p. ej. clones 24 y 34). La semejanza mínima entre los clones de dAb de V_H seleccionados fue del 94 % ((127/136) x 100).

- 5 A continuación, los dAb de unión a albúmina sérica se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de capturar antígeno biotinilado de la solución. Se siguió el protocolo ELISA (como antes) con la salvedad de que las placas de ELISA se recubrieron con 1 µg/ml de proteínas L (para los clones V_κ) y 1 µg/ml de proteínas A (para los clones V_H). El dAb soluble fue capturado de la solución como en el protocolo y la detección se realizó con MSA o HSA biotiniladas y HRP de estreptavidina. Las MSA y HSA biotiniladas se han preparado siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de conseguir una media de 2 biotinas por albúmina sérica molécula. Se identificaron 24 clones que capturaron MSA biotinilada de la solución en ELISA, Tabla 5. Dos de ellos (los clones 2 y 38 mostrados a continuación) también capturaron HSA biotinilada. A continuación, los dAb se sometieron a ensayo para comprobar su capacidad de unirse a MSA recubierta en un chip Biacore CM5. Se encontraron ocho clones que se unían a la MSA en Biacore.

15 Tabla 5

dAb (todos capturan MSA biotinilada)	H o κ CDR1	CDR2	CDR3	Se une a MSA en Biacore	Captura HSA biotinilada
Molde biblioteca V _κ 3 (entrenamiento)	κ XXXLX	XASXLQS	QQXXXXPXT		
2, 4, 7, 41,	κ SSYLN	RASPLQS	QQTYSVPPT		✓ los 4 se unen
38, 54	κ SSYLN	RASPLQS	QQTYRIPPT		✓ los dos se unen
46, 47, 52, 56	κ FKSLK	NASYLQS	QQVVYWPVT		
13, 15	κ YYHLK	KASTLQS	QQVRKVPRT		
30, 35	κ RRYLK	QASVLQS	QQGLYPPI		
19,	κ YNWLK	RASSLQS	QQNVVIPRT		
22,	κ LWHLR	HASLLQS	QSAVYPKT		
23,	κ FRYLA	HASHLQS	QQRLYPKT		
24,	κ FYHLA	PASKLQS	QQRARWPRT		
31,	κ IWHLN	RASRLQS	QQVARVPRT		
33,	κ YRYLR	KASSLQS	QQYVGYPR		
34,	κ LKYLK	NASHLQS	QQTYYPI		
53,	κ LRYLR	KASWLQS	QQVLYPQT		
11,	κ LRSLK	AASRLQS	QQVVYWPAT	✓	
12,	κ FRHLK	AASRLQS	QQVALYPKT	✓	
17,	κ RKYLR	TASSLQS	QQNLFWPRT	✓	
18,	κ RRYLN	AASSLQS	QQMLFYPKT	✓	
16, 21	κ IKHLK	GASRLQS	QQGARWPQT	✓	
25,26	κ YYHLK	KASTLQS	QQVRKVPRT	✓	
27,	κ YKHLK	NASHLQS	QQVGRYPKT	✓	
55,	κ FKSLK	NASYLQS	QQVVYWPVT	✓	

Molde biblioteca V _H 1 (y 2) (entrenamiento)	H XXYXXX	XIXXXGXXTXYADSVKG	XXXX (XXXX) FDY	
8, 10	H WVYQMD	SISAFGAKTLYADSVKG	LSGKFDY	
36,	H WSYQMT	SISSFGSSTLYADSVKG	GRDHNYSLFDY	

En todos los casos los marcos eran idénticos a los marcos en la secuencia de entrenamiento correspondiente, con diversidad en las CDR como se indica en la Tabla 5.

- De los ocho clones que se unieron MSA en Biacore, se eligieron dos clones que están altamente expresados en *E. coli* (clones MSA16 y MSA26) para estudio adicional (véase Ejemplo 10). En la Figura 16 se ofrecen las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos para MSA16 y 26.

Ejemplo 10.

Determinación de la afinidad y la semivida en suero en ratón de los dAb de unión a MSA MSA16 y MSA26.

- Como se describe en el documento US20060251644, un método común para determinar la afinidad de unión consiste en valorar la asociación y las constantes de velocidad de disociación usando un sistema de resonancia por plasmones superficiales de Biacore™ (Biacore, Inc.). Se activa un chip de biosensores para acoplamiento covalente de la diana siguiendo las instrucciones del fabricante (Biacore). A continuación se diluye la diana y se inyecta en el chip para obtener una señal en unidades de respuesta (RU) de material inmovilizado. Como la señal en RU es proporcional a la masa de material inmovilizado, esto representa un intervalo de densidades diana inmovilizadas en la matriz. Los datos de disociación se ajustan a un modelo de un sitio para obtener k_{off} +/- d.t. (desviación típica de medidas). Se calculan constantes de velocidad (K_d) de pseudoprimer orden para cada curva de asociación, y se representa gráficamente en función de la concentración de proteínas para obtener k_{on} +/- e.s. (error estándar de ajuste). Las constantes de disociación de equilibrio para la unión, K_d , se calculan a partir de medidas SPR como k_{off}/k_{on} .
- Los dAb MSA16 y MSA26 se expresaron en el periplasma de *E. coli* y se purificaron usando absorción de lotes para la resina de afinidad de la proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) seguido por elución con glicina a pH 2,2. A continuación se analizaron los dAb purificados por inhibición Biacore para determinar K_d . Brevemente, los MSA16 y MSA26 purificados se sometieron a ensayo para determinar la concentración de dAb necesaria para conseguir 200 RU de respuesta en un chip CM5 de Biacore recubierto con una alta densidad de MSA. Una vez determinadas las concentraciones requeridas de dAb, se premezcló el antígeno de MSA a un intervalo de concentraciones en torno a la K_d esperada con el dAb y se incubó durante toda la noche. A continuación se midió la unión al chip de Biacore recubierto con MSA de dAb en cada una de las premezclas a una alta velocidad de flujo de 30 μ l/minuto. Las afinidades se determinan usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991). El sistema Biacore (Uppsala, Suecia) es un método preferido para determinar la afinidad de unión. El sistema Biacore emplea resonancia por plasmones superficiales (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton y Myszk, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) para controlar las interacciones biomoleculares en tiempo real. El análisis Biacore genera convenientemente constantes de velocidad de asociación, constantes de velocidad de disociación, constantes de disociación de equilibrio y constantes de afinidad. Las curvas resultantes se usaron para crear representaciones gráficas de Klotz (Klotz, I.M. (1982) Science 217:1247-1249 y Klotz, I.M. (1983) J. Trends in Pharmacol. Sci. 4:253-255) que proporcionaron una K_d estimada de 200 nM para MSA16 y 70 nM para MSA 26 (Figura 17A y B).

- A continuación, se clonaron clones MSA16 y MSA26 en un vector de expresión con la marca HA marca (secuencia de ácidos nucleicos: TATCCTTATGATGTTCTGATTATGCA y secuencia de aminoácidos: YPYDVPDYA) y se expresaron cantidades de 2-10 mg en *E. coli* y se purificaron a partir del sobrenadante con resina de afinidad de la proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) y se eluyó con glicina a pH 2,2. Se determinó la semivida en suero de los dAb en ratón. Se dosificaron MSA26 y MSA16 como inyecciones i.v. individuales a aproximadamente 1,5 mg/kg en ratones CD1. El análisis de los niveles séricos se realizó mediante captura de anti-HA de cabra (Abcam, RU) y detección de proteínas L-HRP (Invitrogen) La ELISA fue bloqueada con Marvel al 4 %. El lavado se realizó con PBS Tween al 0,05 %. Se determinaron las curvas estándar de concentraciones conocidas de dAb en presencia de suero de ratón 1x para garantizar la comparabilidad con las muestras de prueba. La modelización con un modelo de 2 compartimentos mostró que MSA-26 tenía un $t_{1/2\alpha}$ de 0,16 h, un $t_{1/2\beta}$ de 14,5 h y un área bajo la curva (ABC) de 465 h.mg/ml (datos no mostrados) y MSA-16 tenía un $t_{1/2\alpha}$ de 0,98 h, un $t_{1/2\beta}$ de 36,5 h y un ABC de 913 h.mg/ml (figura 18). Los dos clones de anti-MSA tenían una semivida considerablemente más larga que con HEL4 (un dAb de antilisoizima de clara de huevo de gallina) que tenía un $t_{1/2\alpha}$ de 0,06 h y un $t_{1/2\beta}$ de 0,34 h.

- Ejemplo 11. Creación de fragmentos de tipo Fab específicos dobles de V_H-V_H y V_K-V_K

Este ejemplo describe un método para preparar V_H-V_H y V_K-V_K dobles específicos como fragmentos de tipo Fab.

Antes de construir cada uno de los fragmentos de tipo Fab descritos, se seleccionaron primero los dAb que se unen a las dianas de elección entre bibliotecas de dAb similares a las descritas en el ejemplo 9. Se aisló un dAb de V_H , HEL4, que está unido a lisozima de huevo de gallina (Sigma) y se aisló también un segundo dAb de V_H (TAR2h-5) que está unido a un receptor de TNF α (sistemas R y D). Las secuencias de los mismos se proporcionan en el listado de secuencias. Se aisló un dAb de V_k que se une a TNF α (TAR1-5-19) por selección y maduración de afinidad y la secuencia se indica también en el listado de secuencias. En estos experimentos se usó también un segundo dAb de V_k (MSA 26) descrito en el ejemplo 9 cuya secuencia está en la figura 17B.

El ADN de los vectores de expresión que contienen los cuatro dAb descritos anteriormente fue digerido con enzimas Sall y NotI para escindir el ADN que codifica el dAb. Se purificó una banda del tamaño esperado (300-400 pb) haciendo pasar el material digerido en un gel de agarosa y escindiendo la banda, seguido por purificación de tipo gel usando el kit de purificación la purificación de gel Qiagen (Qiagen, RU). El ADN que codifica los dAb se insertó a continuación en los vectores C_H o C_k (Figuras 8 y 9) como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6

dAb	Antígeno diana	V_H de dAb o V_k de dAb	Introducido en vector	Marca (extremo C)	Resistencia a antibióticos
HEL4	Lisozima de huevo de gallina	V_H	C_H	myc	Cloranfenicol
TAR2-5	TNF receptor	V_H	C_k	flag	Ampicilina
TAR1-5-19	TNF α	V_k	C_H	myc	Cloranfenicol
MSA 26	Albúmina sérica de ratón	V_k	C_k	flag	Ampicilina

Las construcciones C_H de V_H y C_k de V_H se cotransformaron en células HB2151. De forma separada, las construcciones C_H de V_k y C_k de V_k se cotransformaron en células HB2151. Se cultivaron los cultivos de cada una de las líneas celulares cotransformadas durante toda la noche (en 2xTy que contenía glucosa al 5 %, 10 μ g/ml de cloranfenicol y 100 μ g/ml de ampicilina para mantener la selección de antibióticos para los plásmidos de C_H y C_k). Los cultivos durante toda la noche se usaron para inocular medio nuevo (2xTy, 10 μ g/ml de cloranfenicol y 100 μ g/ml de ampicilina) y se cultivaron a DO 0,7-0,9 antes de la inducción mediante la adición de IPTG para expresar sus construcciones de C_H y C_k . A continuación se purificó el fragmento de tipo Fab a partir del periplasma mediante purificación de proteínas A (para C_H de V_H y C_k de V_H cotransformados) y purificación con resina de afinidad de MSA (para C_H de V_k y C_k de V_k cotransformados).

V_H - V_H específico doble

La expresión de C_H de V_H y C_k de V_H específico doble se sometió a ensayo aplicando la proteína en un gel. Se transfirió el gel y pudo detectarse una banda del tamaño esperado para el fragmento Fab en la transferencia Western por medio de la marca myc y la marca flag, lo que indica que las partes de C_H de V_H y C_k de V_H del fragmento de tipo Fab estaban presentes. A continuación, con el fin de determinar si las dos mitades del específico doble estaban presentes en el mismo fragmento de tipo Fab, se recubrió una placa ELISA durante toda la noche a 4 °C con 100 μ l por pocillo de lisozima de huevo de gallina (HEL) a 3 mg/ml en tampón de bicarbonato de sodio. A continuación se bloqueó la placa (como se describe en el ejemplo 1) con PBS Tween al 2 % seguido por incubación con el fragmento de tipo Fab de C_H de V_H / C_k de V_H . La detección de unión del específico doble de HEL se realizó por medio de la cadena no semejante usando 9e10 (un anticuerpo monoclonal que se une a la marca myc, Roche) e IgG-HRP anti-ratón (Amersham Pharmacia Biotech). La señal para el fragmento de tipo Fab C_H de V_H / C_k de V_H específico doble fue de 0,154 en comparación con una señal de fondo de 0,069 para la cadena de C_k de V_H expresado en solitario. Esto demuestra que el fragmento de tipo Fab tiene especificidad de unión para el antígeno diana.

V_k - V_k específico doble

Después de purificar el fragmento de tipo Fab de C_H de V_k y C_k de V_k específico doble cotransformado en una resina de afinidad de MSA, la proteína resultante se usó para sondear una placa ELISA recubierta con 1 μ g/ml de TNF α y una placa ELISA recubierta con 10 μ g/ml de MSA. Como se ha predicho, existía una señal por encima del fondo cuando se detectó con L-HRP de proteína en las dos placas de ELISA (datos no mostrados). Esto indicaba que la fracción de proteína capaz de unirse a MSA (y por tanto purificada en la columna de afinidad de MSA) fue también capaz de unirse a TNF α en una ELISA posterior, lo que confirma la doble especificidad del fragmento de anticuerpo. A continuación se usó esta fracción de proteínas para dos experimentos posteriores. En primer lugar, se sondeó una placa ELISA recubierta con 1 μ g/ml de TNF α con fragmento de tipo Fab específico doble C_H de V_k y C_k

de V_k y también con un dAb de unión a TNF α de control a una concentración calculada para proporcionar una señal similar en ELISA. El dAb específico doble y el de control se utilizaron para sondear la placa ELISA en presencia y en ausencia de 2 mg/ml de MSA. La señal en el pocillo específico doble se redujo en más del 50 % pero la señal en el pocillo de dAb no se redujo en absoluto (véase figura 19a). También se puso la misma proteína en el ensayo del receptor con y sin MSA y se mostró la competencia por MSA (véase figura 19c). Así se demuestra que la unión de MSA al específico doble es competitiva con la unión a TNF α .

Ejemplo 12. Creación de un cis específico doble de V_k-V_k unido con especificidad para albúmina sérica de ratón y TNF α

Este ejemplo describe un método para preparar un fragmento de anticuerpos específico doble específico para albúmina sérica de ratón y TNF α por acoplamiento químico por medio de un enlace de disulfuro. Los dAb de MSA16 (del ejemplo 1) y TAR1-5-19 se volvieron a clonar en un vector basado en pET con una cisteína en el extremo C y sin marcas. Los dos dAb se expresaron en niveles de 4-10 mg y se purificaron a partir del sobrenadante que emplea la resina de afinidad de la proteína L-agarosa (Afitiech, Noruega). A continuación se redujeron los dAb marcados con cisteína con ditiotreitól. A continuación se acopló el dAb de TAR1-5-19 con ditiopiridina para bloquear la reformación de enlaces de disulfuro que producen la formación de homodímeros PEP 1-5-19. A continuación se mezclaron los dos dAb diferentes a pH 6,5 para promover la formación de enlaces de disulfuro y la generación de heterodímeros unidos en cis TAR1-5-19, MSA16. Este método para producir conjugados de dos proteínas diferentes fue descrito originalmente por King *et al.* (King TP, Li Y Kochoumian L Biochemistry. 1978 vol 17:1499-506 Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation). Los heterodímeros se separaron de las especies monoméricas por intercambio de cationes. La separación se confirmó mediante la presencia de una banda del tamaño esperado en un gel de SDS. La especie heterodimérica resultante se sometió a ensayo en el ensayo de receptores de TNF y se encontró que tenía una CI₅₀ para neutralizar TNF de aproximadamente 18 nM. A continuación, se repitió el ensayo de receptor con una concentración constante de heterodímero (18 nM) y una serie de dilución de MSA y HSA. La presencia de HSA en un intervalo de concentraciones (hasta 2 mg/ml) no produjo una reducción en la capacidad del dímero de inhibir la TNF α . Sin embargo, la adición de MSA produjo una reducción dependiente de la dosis en la capacidad del dímero de inhibir TNF α (figura 20). Esto demuestra que MSA y TNF α compiten por la unión en el dímero TAR1-5-19, MSA16 unido en cis.

Resumen de datos

En el Anexo 4 se indica un resumen de datos obtenidos en los experimentos recogidos en los ejemplos precedentes.

Ejemplo 13.

Selección y caracterización de dAb para la unión a albúmina sérica a partir de un conjunto de especies.

Se seleccionaron dAb frente a albúmina sérica humana, albúmina sérica de ratón y albúmina sérica porcina como se describe anteriormente para los dAb anti-MSA salvo por las siguientes modificaciones en el protocolo: las bibliotecas de fagos de dominios sintéticos V_H fueron las bibliotecas 4G y 6G, que se basan en un V_H3 humano que comprende el gen de línea germinal DP47 gen y el segmento J_H4 para el V_H y un V_k1 humano que comprende el gen de línea germinal DPK9 y el segmento J_k1 para V_k. Las bibliotecas comprenden 1 x 10¹⁰ clones individuales. Se ha preseleccionado un subconjunto de las bibliotecas de V_H y V_k para proteína A y la proteína L de unión a ligandos genéricos respectivamente de manera que la mayoría de los clones en las bibliotecas no seleccionadas eran funcionales. Los tamaños de las bibliotecas mostrados anteriormente se corresponden con los tamaños después de la preselección.

Se realizaron dos o tres tandas de selección en albúmina sérica de ratón, porcina y humana usando subconjuntos de las bibliotecas de las bibliotecas V_H y V_k por separado. Para cada selección, el antígeno (i) se recubrió en un inmunotubo (nunc) en 4 ml de PBS a una concentración de 100 μ g/ml, o (ii) se sometió a biotilación y a continuación se usó selección soluble seguido por captura en perlas de estreptavidina o perlas de neutravidina. En cada caso, después de la segunda o la tercera tanda de selección, el ADN de la selección se clonó en un vector de expresión para la producción de dAb soluble, y se tomaron colonias individuales. Los fragmentos de dAb soluble se produjeron como se describe para fragmentos scFv por Harrison *et al.* (Methods Enzymol. 1996; 267:83-109) y para cada selección, se sometieron a ensayo 96 clones solubles para la unión a un intervalo de albúminas séricas.

El cribado de clones para la unión a albúminas séricas a partir de un intervalo de especies se realizó usando un instrumento de resonancia por plasmones superficiales Biacore (Biacore AB). Se recubrió un chip de Biacore CM-5 con albúmina sérica de diferentes especies a alta densidad en cada de células de flujo 2 a 4. Se secuenciaron los dAb que mostraron unión a una o más albúminas séricas de interés y se expresaron en una escala de 50 ml, se purificó en la proteína L y a continuación se cribó a una concentración conocida para la unión a un panel de albúminas séricas en un chip CM-5 Biacore recubierto con baja densidad de albúmina sérica en las células de flujo 2 a 4. Se encontraron varios dAb que se unen a albúmina sérica a partir de un intervalo de diferentes especies, en donde los candidatos preferidos se recogen, con sus perfiles de unión, en la Tabla 7.

Tabla 7

	HSA (afinidad si se mide)	RSA (afinidad si se mide)	MSA (afinidad si se mide)	Cyno (afinidad si se mide)
DOM7h-9	Se une 200 nM	se une	se une	se une
DOM7h-10	se une	ND	ND	ND
DOM7h-11	se une	se une	se une	se une
DOM7h-12	se une	ND	se une	se une
DOM7h-13	se une	se une	se une	
DOM7h-14	Se une 38 nM	se une	Se une 27 nM	Se une 123 nM

En este experimento, se han aislado por tanto dAb que se unen a HSA y albúmina a partir de uno o más de un intervalo de especies no humanas. Por ejemplo, se han encontrado dAb que se unen a albúmina de (i) ser humano y ratón, (ii) ser humano y cynomolgus, (iii) ser humano y rata y (iv) ser humano, ratón, rata y cyno.

Ejemplo 14.

Determinación de la semivida en suero en rata y mono cynomolgus de proteínas de fusión de marca de epítipo dAb/HA de unión a albúmina sérica o marca de epítipo dAb/myc y determinación de la semivida en suero.

Los dAb de anti-albúmina sérica de cynomolgus se expresaron con marcas myc o HA en el extremo C en el periplasma de *E. coli* y se purificaron usando absorción por lotes en resina de afinidad de la proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) para dAb de Vk y absorción por lotes en resina de afinidad de la proteína A para dAb de VH, seguido por elución con glicina a pH 2,0. Con el fin de determinar la semivida en suero, se suministró a grupos de 3 macacos cynomolgus una única inyección i.v. a 2,5 mg/kg de DOM7h-9, DOM7h-11 o DOM7h-14. Se obtuvieron muestras de sangre mediante sangrados en serie de una arteria o vena femoral durante un periodo de 21 días y se preparó suero de cada muestra. Se analizaron las muestras de suero mediante ELISA en sándwich usando anti-HA de cabra (Abcam, Cambridge RU) o anti myc de cabra (Abcam, Cambridge RU) recubiertos en una placa ELISA, seguido por detección con proteína L-HRP. Se ajustaron curvas estándar de concentraciones conocidas de dAb en presencia de suero de cynomolgus a la misma concentración que para las muestras experimentales para garantizar la comparabilidad con las muestras de prueba. Se empleó ajuste con modelización doble exponencial con un modelo de 2 compartimentos (usando el software Kaleidograph (Sinergia software, PA, EE.UU.)) para calcular $t_{1/2\beta}$, véase Tabla 8.

Se expresaron los dAb de albúmina sérica de anti-rata con marcas myc o HD en el extremo C en el periplasma de *E. coli* y se purificaron usando absorción por lotes en resina de afinidad de la proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) seguido por elución con glicina a pH 2,0. A continuación se etiquetaron los dAb con ^3H usando el método siguiente: Se preparó un vial por proteína: se dispensaron 300 μL de NSP en el vial y se extrajo el disolvente bajo un suave flujo de nitrógeno a ≤ 30 °C. A continuación se resuspendió el residuo en DMSO (100 μL). Se añadió una parte alícuota de solución de proteína (2,5 mL) a la solución de DMSO y se incubó la mezcla durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación se cargaron exactamente 2,5 ml de la solución en una columna PD10 equilibrada previamente (preequilibrada con 25 mL de suero salino con tampón de fosfato, PBS) y se desechó el eluido. Se añadió suero salino con tampón de fosfato (PBS, 3,5 mL) y se recogió el eluido. Así se obtiene una solución de proteínas etiquetada a aproximadamente 2 mg/mL. Se determinó la actividad específica del material y condicionado a un etiquetado eficaz, se empleó la solución inmediatamente o se almacenó a -20 °C hasta que se necesitara.

Para determinar la semivida en suero, se administró a grupos de 4 ratas una única inyección i.v. a 2,5 mg/kg de DOM7h-9, DOM7h-11, DOM7h-13 o DOM7h-14. Las muestras de sangre se obtuvieron de una vena caudal durante un periodo de 7 días y se preparó el plasma. Se determinaron los niveles de ^3H mediante recuento por centelleo líquido y se calculó la concentración de proteínas etiquetadas en cada muestra según la actividad específica conocida de la proteína administrada al principio del experimento. Se empleó ajuste de modelización de doble exponencial con un modelo de 2 compartimentos (usando el software Kaleidograph (Sinergia software, PA, EE.UU.)) para calcular $t_{1/2\beta}$, véase Tabla 8.

Tabla 8

Agente	Armazón	t1/2 β (cyno)	t1/2 β (rata)
DOM7h-9	V _K	3,8 días	66 horas
DOM7h-11	V _K	5,2 días	61 horas
DOM7h-13	V _K	no probado	73 horas
DOM7h-14	V _K	6,8 días	56 horas
DOM7r-3	V _K		53 horas
DOM7r-16	V _K		43 horas
DOM7h-9	V _K	3,8 días	66 horas
DOM7h-11	V _K	5,2 días	61 horas
DOM7h-13	V _K	no probado	73 horas
DOM7h-14	V _K	6,8 días	56 horas
DOM7r-3	V _K		53 horas
DOM7r-16	V _K		43 horas

La semivida de albúmina en rata y mono cynomolgus es 53 horas (determinada experimentalmente) y 7-8 días (estimada) respectivamente. En la Tabla 8 puede verse que la semivida de los dAb DOM7r-3, DOM7h-9, DOM7h-11, DOM7h-13 y DOM7h-14 en rata se aproxima o es sustancialmente la misma que la semivida de albúmina en rata. También, puede verse que la semivida de los dAb DOM7h-11 y DOM7h-14 en cynomolgus se aproxima o es sustancialmente la misma que la semivida de albúmina en cynomolgus. El dAb DOM7h-14 tiene una semivida en rata y cynomolgus que es sustancialmente la misma que la semivida de albúmina en las dos especies.

Ejemplo 15. Cartografía de epítomos

10 Los tres dominios de albúmina sérica humana se han expresado previamente en *Pichia pastoris* (Dockal Carter y Ruker (1999) *J. Biol. Chem.* 2000 Feb 4; 275(5):3042-50. Se expresan los mismos dominios usando el vector usando pPICZaA de *Pichia pastoris* y en el que se requirió purificación para lograr la homogeneidad en matriz de SA Mimetic Blue (proveedor: Prometic Biosciences) de la Figura 21. La identificación del dominio de albúmina sérica unido por los dAb se evaluó mediante uno de dos métodos posibles, inmunoprecipitación de anticuerpos de dominio y 15 competencia Biacore. Los resultados se muestran más adelante en la Figura 22 y la Figura 23.

Para ensayo de inmunoprecipitación, se ajustó 1 ml de sobrenadante de *Pichia pastoris* que expresaba el dominio I, II o III de HSA a pH 7,4, y se mezcló con 1 μ g de dAb, y 10 μ l de Proteína A o Proteína L agarosa (para los dAb de V_H o V_K respectivamente). Se mezcló la mezcla por inversión durante 1 hora para permitir la formación de complejos, y a continuación se recuperó el complejo unido a agarosa por centrifugación a 13.000x g durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el material sedimentado una vez con PBS, y se recuperó por 20 centrifugación. A continuación se resuspendieron las perlas en tampón de carga SDS-PAGE que contenía ditioneitol (DTT), se lavó a 70 °C durante 10 minutos, y a continuación se hizo pasar por geles SDS-PAGE NuPAGE al 4-12 % (proveedor: Invitrogen), y se tiñó con tinción segura SimplyBlue.

Para ensayo de competencia con Biacore, se prepararon dAb purificados hasta 1 μ M en HBS-EP a pH 7,4, o 1 μ M 25 en 50 mM de tampón de fosfato citrato, NaCl 150 mM, pH 5,0, y cuando fue necesario, con 7 μ M de dominio de HSA purificado. Se efectúan preparaciones con Biacore a una velocidad de flujo de 30 μ l/min sobre una superficie de chip CM5 recubierta con 500-1.000 RU de albúmina sérica humana, y una célula de referencia empleada para realizar la sustracción de base.

La Tabla 9 proporciona una lista de los dAb específicos para albúmina sérica humana y el o los dominios de 30 albúmina sérica humana con los que realizar la cartografía (como se determina por inmunoprecipitación y/o Biacore):

Tabla 9

Clon	H/K	Dominio HSA cartografiado
DOM7h-1	K	Dominio II
DOM7h-2	K	Nd
DOM7h-6	K	Nd
DOM7h-7	K	Nd
DOM7h-8	K	Dominio II
DOM7h-9	K	Dominio II
DOM7h-10	K	Nd
DOM7h-11	K	Dominio II
DOM7h-12	K	Dominio II
DOM7h-13	K	Dominio II
DOM7h-14	K	Dominio II
DOM7h-21	H	Nd
DOM7h-22	H	Dominio I+III
DOM7h-23	H	Nd
DOM7h-24	H	Nd
DOM7h-25	H	Nd
DOM7h-26	H	Nd
DOM7h-27	H	Dominio III
DOM7h-30	H	Dominio III
DOM7h-31	H	Nd

Nd: no determinado

En conclusión, la mayoría de los dAb se unen al 2º dominio de HSA y por tanto no se espera que compitan con la unión de albúmina sérica humana a FcRn. Dos dAb (DOM7h-27 y DOM7h-30) se unen al Dominio III.

dAb	Dominio HSA unido	RU unión a HSA a 1 μ M pH 7,4	RU unión a HSA a 1 μ M pH 5,0	His en CDR
DOM7h-1	II	600c	150	no
DOM7h-3	NI	0	0	
DOM7h-4	NI	0	0	
DOM7h-8	II	1000	250	no
DOM7h-9	II	150	0	CDR1
DOM7h-11	II	250	0	CDR3
DOM7h-12	Ila	55	0	no
DOM7h-13	II	300	40	2 en CDR3
DOM7h-14	II	20	0	no

DOM7h-22	I + IIIb	100c	0	CDR2
DOM7h-27	III	50	0	no
DOM7h-30	III	320	35	no

Resumen de resultados de cartografía de epítomos de unión a HSA AlbuAb™ (dAb que se unen específicamente a albúmina sérica) y datos de Biacore a pH 7,4 y 5,0.

Ejemplo 16 Selección de dAb in vitro en presencia de metabolitos

- 5 Las moléculas de albúmina acumulan los efectos de la exposición a otros compuestos en suero durante su vida de unos 19 días. Estos efectos incluyen la unión de numerosas moléculas que tienen afinidad por la albúmina que incluyen pero preferiblemente no se limitan a cisteína y glutatión transportados como disulfuros mixtos, vitamina B₆, δ-bilirrubina, hemina, tiroxina, ácidos grasos de cadena larga y media y glucosa transportada en grupos ε-amino. Además, metabolitos como acetaldehído (un producto del metabolismo del etanol en el hígado), metabolitos de
- 10 ácidos grasos, acil-glucurónido y metabolitos de bilirrubina. Además, muchos fármacos como warfarina, halotano, salicilato, benzodiacepinas y otros (revisados en Fasano *et al.* 2005, IUBMB Life)) y también 1-O-gemfibrocil-β-D-glucurónido se unen a albúmina sérica.

Los compuestos que se encuentran ligados a albúmina sérica suelen unirse en determinados sitios en la molécula de albúmina, con lo que potencialmente bloquean estos sitios para la unión de otras moléculas como AlbuAbs™ (un

15 dAb que se une específicamente a albúmina sérica). Se han identificado los sitios de unión para muchos ligandos, los principales y mejor caracterizados sitios de unión se denominan "sitio Sudlow 1" y "sitio Sudlow 2". Según esta nomenclatura, el Sitio 1 está situado en el sub-dominio IIA, y se une a warfarina y otros fármacos que en general son moléculas aniónicas heterocíclicas voluminosas. El Sitio 2 está situado en el subdominio IIIA, y se une a ácidos

20 del sitio 2 estereotípico, ibuprofeno. Los sitios de unión secundarios para warfarina e ibuprofeno se han identificado en los dominios II y I respectivamente. Existen también otros sitios y sub-sitios de unión de estos, lo que significa que en la circulación, la albúmina sérica existe con una mezcla compleja de ligandos unidos, con afinidades que varían de 1×10^{-2} M a 1×10^{-8} M. Por ejemplo, el ácido oleico está unido a hasta 7 sitios en SA (*J Mol Biol.* 2001; 314:955-60).

- 25 La albúmina sérica humana ha estado en complejo cristalizado con ácidos grasos (Petitpas I, Grune T, Bhattacharya AA, Curry S. *Nat. Struct Biol.* (1998) 5: 827-35). Los sitios de unión para estas moléculas están situados en hendiduras hidrófobas en torno a la superficie de SA, con una distribución asimétrica, a pesar de la cercana simetría triple de la molécula de HSA. Más adelante, el uso de varios fragmentos recombinantes de albúmina sérica ha ayudado a la asignación más precisa de la contribución de los dominios a la formación de los sitios de unión (por
- 30 ejemplo: *Protein Sci* (2000) 9:1455-65; *J Biol Chem.* (1999) 274:29303-10). El desplazamiento de ligandos unidos desde SA desempeña un papel importante en las interacciones entre fármacos, por ejemplo la semivida de warfarina se reduce cuando es desplazada de la SA por el etanol (*J Biol Chem.* (2000) 275:38731-8). La afinidad de otros fármacos por SA se ve modificada por la presencia de otros fármacos en otros sitios de unión. Por ejemplo, la unión de diacepam en el sitio 2 aumenta la afinidad del sitio 1 por tenoxicam, como consecuencia de cambios
- 35 conformacionales en la unión. Este hecho afecta significativamente a las propiedades farmacocinéticas (*Fundam Clin Pharmacol.* (1989) 3:267-79).

Así, para un AlbuAb™ de unión a SA (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica), es deseable seleccionar uno que no modifique las características de unión de albúmina sérica para fármacos unidos a SA. Además, cuando se ha demostrado que la unión al fármaco modifica la conformación de SA, es deseable tener un

40 AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) que se una a SA tanto en presencia como en ausencia del fármaco. Estos planteamientos significan que será posible identificar un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) de manera que no existan interacciones positivas o negativas importantes con productos farmacéuticos clave. Por tanto, este ejemplo describe una selección de fagos para identificar los dAb que se unen a albúmina sérica en presencia de compuestos y metabolitos que probablemente estarán presentes unidos

45 a albúmina *in vivo*. Las selecciones de fagos se realizan en presencia de uno o varios de los metabolitos o compuestos que según se conoce interaccionan con albúmina sérica *in vivo*. Estas selecciones identifican los AlbuAb™ (dAb que se unen específicamente a albúmina sérica) que se unirán a albúmina sérica de una manera que es improbable que se vea impedida por la presencia de metabolitos u otros compuestos.

Las bibliotecas de fagos descritas en el Ejemplo 1 se emplean como se describe en el Ejemplo 1 para selección

50 frente a albúmina de uno o más de entre un intervalo de especies que incluye el ser humano, el mono cynomolgus, la rata y el ratón. La albúmina empleada como un antígeno es diferente de la descrita en el Ejemplo 1 en que se preincubará durante toda la noche con un metabolito o compuesto a una concentración 10-100 veces superior que la albúmina en sí. Esto puede hacerse con un único compuesto o metabolito, o con más de un compuesto o metabolito. En particular, puede ser en presencia de compuestos que ocupen los sitios de albúmina I o II o ambos. Esta

concentración de metabolito está presente también en el tampón empleado para recubrir los inmunotubos con antígeno y en los tampones empleados durante las etapas clave de la selección. Las etapas en las que están presentes los metabolitos incluyen el tampón MPBS de bloqueo empleado para bloquear los inmunotubos recubiertos con antígeno o el antígeno biotinilado (para selecciones de solución) y también el tampón en el que se
 5 bloquea la biblioteca de fagos. De esta forma, cuando se añaden los fagos bloqueados al inmunotubo o al antígeno biotinilado, la concentración de metabolito se mantiene. Por tanto, a lo largo de las fases de la selección en las que se selecciona el fago que se une a la albúmina, los metabolitos que pueden bloquear determinados sitios en la molécula de albúmina in vivo también están presentes, compitiendo con el fago para la unión y sesgando la selección en favor de aquellos dAb que se unen a sitios en la albúmina diferentes de los bloqueados por los
 10 metabolitos.

En otro conjunto de selecciones, se realizan tandas alternas de selección frente a albúmina sérica en presencia y ausencia de compuestos o metabolitos unidos. Así se asegura que se seleccionan los dAb capaces de unirse a albúmina sérica en presencia y en ausencia de compuestos unidos. En los dos esquemas de selección, es posible que se seleccionen los dAb que son capaces de desplazar el fármaco unido a albúmina sérica, y esto se criba
 15 mediante la medida de la capacidad del AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) de desplazar el fármaco unido a SA. Estos ensayos están bien establecidos para fármacos de molécula pequeña, y se adaptan fácilmente para este fin. Puede usarse una variedad de métodos bien conocidos en la técnica para determinar la capacidad de un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) de desplazar fármacos unidos a SA. Comprenden desde diálisis en equilibrio, métodos cromatográficos en albúmina sérica o
 20 ligandos inmovilizados, a través de análisis de RMN. El ejemplo siguiente describe el uso del método de diálisis en equilibrio más sencillo. Los otros métodos técnicamente más complejos suministrarán esencialmente la misma información.

Una solución de albúmina sérica se prepara a una concentración definida en un tampón fisiológico, por ejemplo, tampón de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. El fármaco se prepara en un tampón similar, y se
 25 sintetizado de manera que conserva sus propiedades farmacológicas originales, pero está radiomarcado, por ejemplo con tritio o ¹⁴C. El fragmento de anticuerpo de unión a albúmina sérica se prepara a una concentración definida en un tampón similar.

La solución de albúmina sérica se coloca en una serie de tubos, y se añade una cantidad creciente de AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica), de manera que la concentración de albúmina sérica en cada tubo es fija (por ejemplo al 1 % p/v, aproximadamente 150 μM), mientras que la concentración del (dAb que se
 30 une específicamente a albúmina sérica)™ está comprendida entre 0 y 150 μM en la serie de tubos. Esto comprende un conjunto experimental.

Se añade al tubo un tubo o recipiente de diálisis que contiene una concentración fija del ligando radiomarcado para cada conjunto. Puede ser adecuada una concentración comprendida entre 0,2 y 10 mM, dependiendo del ligando
 35 empleado, de su afinidad y de su solubilidad.

El tamaño de corte de la membrana empleada para diálisis debería ser tal que la albúmina sérica y AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) no se difundan a su través, sino que el ligando radiomarcado pueda difundirse libremente. Para este fin es suficiente un tamaño de corte de 3,5 kDa.

Se agita la mezcla a una temperatura fija, por ejemplo 37 °C, para un periodo de tiempo fijo, para permitir el
 40 equilibrio del fármaco radiomarcado entre los dos compartimentos, por ejemplo, 5 horas. Después de este tiempo, debería alcanzarse el equilibrio en el que influye la capacidad de AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) de unirse a la albúmina sérica para inhibir la unión al fármaco.

Los dos compartimentos son muestras, y la radioactividad se cuenta con un contador de centelleo. La concentración de ligando unido a albúmina puede determinarse por la diferencia en los recuentos entre los dos compartimentos. La
 45 constante de unión estequiométrica K' puede calcularse a partir de la concentración de equilibrio de ligando unido, b , ligando libre, c , y albúmina, p , de acuerdo con la ecuación $K' = b/c(p-b)$. Esto presupone la unión de 1 molécula de ligando con una molécula de albúmina sérica.

A continuación pueden medirse los datos de unión empleando una gráfica de Scatchard de acuerdo con la ecuación $r/c = nk - rk$, en la que r es la fracción de albúmina a la que está unido el ligando (es decir b/p , y n es el número de
 50 sitios de unión por molécula de albúmina, y k es la constante de asociación al sitio. Los valores de n y k pueden determinarse a partir de las gráficas de r/c con respecto a r .

Cuando la unión de un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) bloquea la unión del ligando radiomarcado, este hecho afectará a la constante de unión estequiométrica del ligando y también al número aparente de sitios de unión para el ligando. Puede predecirse que como el AlbuAb™ (un dAb que se une
 55 específicamente a albúmina sérica) se unirá en un sitio definido en la superficie de albúmina sérica, y algunos ligandos tienen más de un sitio de unión en la albúmina sérica, que no todos los sitios de unión se bloquearán. En la situación en que el AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) está unido específicamente a un fármaco que forma complejo con la albúmina sérica y la desplaza, y el fármaco tiene un índice terapéutico bajo y

está unido a suero, entonces la afinidad de corte para distinguir entre un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) capaz de desplazar a la albúmina sérica unida al fármaco desde un AlbuAb™ (un dAb que se une específicamente a albúmina sérica) no capaz de desplazar la albúmina sérica al fármaco, estaría comprendida entre 10 nM y 100 nM. Este método se ilustra en el siguiente artículo: Livesey y Lund Biochem J. 204(1): 265-272 Binding of branched-chain 2-oxo acids to bovine serum albumin.

Ejemplo 17: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón no de inmunoglobulina CTLA-4 de unión a albúmina sérica por medio de injerto de CDR

Los dominios de CDR de dAb7h14 se emplean para construir un polipéptido de armazón de no inmunoglobulinas de antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) que se une a albúmina sérica humana de la forma siguiente.

10 Las secuencias CDR1 (RASQWIGSQLS; SEQ ID NO.:), CDR2 (WRSSLQS; SEQ ID NO.:) y CDR3 (AQGAALPRT ; SEQ ID NO.:) de dAb7h14 se injertan en un mutante truncado soluble de CTLA-4 que comprende el dominio de tipo V de CTLA-4 (como se describe en el documento WO-99/45110; opcionalmente, una forma diseñada de CTLA-4, por ejemplo, en el que los dominios A2 y A3 están suprimidos) en la sustitución de residuos de aminoácidos de CTLA-4 naturales que corresponden a CDR1 (SPGKATE; SEQ ID NO.:) en el lazo S1-S2 (el lazo BC), CDR2
15 (YMMGNELTF; SEQ ID NO.:) y CDR3 (LMYPPYYL; SEQ ID NO.:) en el lazo S5-S6, respectivamente (para detalles sobre la composición y/o la estructura del armazón de CTLA-4 pueden consultarse los documentos WO-00/60070; WO-99/45110; Metzler *et al. Nat. Struct. Biol.* 4: 527-53; y Nuttall *et al. Proteins Struct. Funct. Genet.* 36:217-27, todos incorporados en la presente memoria como referencia en su totalidad). La expresión de este polipéptido derivado de CTLA-4 se realiza en un sistema de expresión basado en pGC, en pPOW u otro sistema de
20 expresión reconocido por la técnica, con la producción prevista de proteínas solubles predominantemente monoméricas. Se analiza la solubilidad de las proteínas de este polipéptido derivado de CTLA-4, y se prevé que será superior al polipéptido de CTLA-4 extracelular natural. El análisis ELISA se emplea para examinar si el polipéptido monomérico purificado se une específicamente a albúmina sérica humana en comparación con antígenos no específicos y en comparación con polipéptidos derivados de CTLA-4 extracelulares injertados con polipéptidos no
25 específicos (por ejemplo, somatostatina sustituida en la estructura de lazo CDR1). Se realiza análisis de unión en tiempo real por Biacore para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a un polipéptido derivado de CTLA-4 inmovilizado que comprende los dominios de CDR de antialbúmina sérica humana de dAb7h14. (Un experto en la técnica reconocerá que la afinidad de unión puede valorarse empleando cualquier método apropiado, que incluye, por ejemplo, precipitación de albúmina sérica humana etiquetada, ensayo Biacore
30 competitivo, etc.). Opcionalmente, la expresión del polipéptido de antialbúmina sérica humana CTLA-4 se potencia mediante el ajuste de la secuencia codificante usando PCR de superposición y empalme para incorporar codones preferentes para la expresión de *E. coli*. Si se detecta afinidad por albúmina sérica humana baja o nula (por ejemplo, valores de Kd en el intervalo de μ M o superiores), se emplea al menos una entre varias estrategias para mejorar las propiedades de unión a albúmina sérica humana del polipéptido de CTLA-4 injertado con CDR, lo que incluye
35 cualquiera de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos de CTLA-4 injertados con CDR que presentan CDR dAb7h14 se optimiza mediante mutagénesis, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o como se conoce en la técnica por otros medios. Los dominios de polipéptidos de armazón CTLA-4 que rodean a las secuencias CDR de dAb7h14 injertadas se someten
40 a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Esta mutagénesis se realiza en la secuencia polipeptídica de CTLA-4 en residuos de aminoácidos no de CDR, con el fin de crear polipéptidos de unión a albúmina sérica humana nuevos o mejorados. Opcionalmente, los dominios de polipéptidos de CDR de dAb7h14 presentados en el polipéptido de CTLA-4 injertado con CDR se someten a mutagénesis, por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria, mutagénesis NNK, mutagénesis de revisión y/u otro método reconocido en la técnica. La
45 PCR se emplea opcionalmente para realizar dichos métodos de mutagénesis, con el resultado de la generación de diversidad de secuencias a través de secuencias direccionadas en los polipéptidos de CTLA-4 injertados con CDR. Estos enfoques son similares a los descritos más adelante para generación de bibliotecas de dAb. Además de métodos de mutagénesis aleatorios y/o de revisión, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos diana en los que la información estructural establece los residuos de aminoácidos específicos críticos para la unión
50 de albúmina sérica humana.

Los polipéptidos de CTLA-4 que comprenden secuencias CDR de dAb7h14 injertadas diseñadas como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos de CTLA-4 que están optimizados para la unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas de CTLA-4 injertadas con CDR dAb7h14, esta biblioteca de dichos
55 polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren la unión a albúmina sérica y/o la proliferación, como se describe más adelante para la selección de dAb en albúmina sérica de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore
60 (Uppsala, Suecia), con los polipéptidos derivados de CTLA-4 totalmente optimizados consiguiendo idealmente valores de afinidad de unión a albúmina sérica humana de Kd en el intervalo de nM o mejor.

Después de la identificación de los polipéptidos derivados de CTLA-4 que se unen a albúmina sérica humana,

dichos polipéptidos se usan a continuación para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Ejemplo 18: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas de CTLA-4 de unión a albúmina sérica por medio de la selección de restos de unión a albúmina sérica

- 5 En una biblioteca se presenta un mutante truncado soluble de CTLA-4 que comprende el dominio de tipo V de CTLA-4 natural (como se describe en el documento WO-99/45110; opcionalmente, una forma diseñada de CTLA-4, por ejemplo, en la que se han suprimido los dominios A2 y A3) y que se ha diseñado para contener una región o regiones de variabilidad, y se somete a selección y, opcionalmente, a técnicas de maduración de afinidad con el fin de producir moléculas de armazón de no inmunoglobulinas de CTLA-4 de unión a albúmina sérica humana para su uso en los ligandos de la invención.

- Se realiza la expresión de este polipéptido derivado de CTLA-4 en un sistema de expresión reconocido basado en pGC, pPOW u otra técnica. Se analiza la solubilidad de proteínas de este polipéptido derivado de CTLA-4, y se realiza mutagénesis para potenciar la solubilidad del o los polipéptidos derivados de CTLA-4 con respecto a los de un polipéptido de CTLA-4 extracelular natural. Se emplea análisis de ELISA para examinar si el polipéptido monomérico purificado se une opcionalmente de forma específica a albúmina sérica humana en comparación con dominios variables individuales no específicos que comprenden un armazón derivado de CTLA-4, y en comparación con polipéptidos extracelulares derivados de CTLA-4 injertados con polipéptidos no específicos (por ejemplo, polipéptido de CTLA-4 con somatostatina sustituida en la estructura de lazo de CDR1). Se realiza análisis de unión en tiempo real por Biacore para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a un polipéptido derivado de CTLA-4 inmovilizado. Opcionalmente, se potencia la expresión del polipéptido de anti-albúmina sérica humana de CTLA-4 mediante el ajuste de la secuencia codificante usando PCR de superposición y empalme para incorporar codones preferentes para expresión de *E. coli*. Después de la detección de afinidad de unión nula o baja (por ejemplo, valores de Kd en el intervalo de μM o superior) de un polipéptido de CTLA-4 para albúmina sérica humana, se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para impartir propiedades de unión a albúmina sérica humana al polipéptido de CTLA-4, que incluye uno o más de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

- La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos de armazón de CTLA-4 se consigue y se optimiza mediante métodos mutagénicos, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o como se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptidos de CTLA-4 se someten a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza sobre la totalidad del polipéptido de CTLA-4 o sobre secuencias específicas en el polipéptido de CTLA-4, dirigiéndose opcionalmente a aminoácidos correspondientes a CDR (por ejemplo, se aleatorizan las regiones CDR1 y/o CDR3, y los polipéptidos resultantes se someten a selección, p. ej., como se describe en el Ejemplo 6 del documento WO-99/45110). Opcionalmente, se dirigen para mutagénesis residuos de aminoácidos específicos para los que se ha determinado o se ha predicho que son estructuralmente importantes para la presentación de lazo de tipo CDR. La mutagénesis, especialmente la mutagénesis aleatorizada, se realiza con el fin de obtener por evolución polipéptidos de unión a albúmina sérica humana nuevos o mejorados. La PCR se usa opcionalmente para llevar a cabo dichos métodos de mutagénesis, lo que lleva a la generación de una diversidad de secuencias a través de las secuencias direccionadas en los polipéptidos de CTLA-4. (Estos planteamientos son similares a los descritos más adelante para generación de bibliotecas de dAb). Además de métodos aleatorios de mutagénesis, se emplea la mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en la que la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos de polipéptidos de CTLA-4 que son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.

- Los polipéptidos de CTLA-4 diseñados como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos de CTLA-4 que están optimizados para la unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas de CTLA-4 mutagenizadas, dicha biblioteca de polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren la unión a albúmina sérica y/o la proliferación, como se describe más adelante para la selección de dAb de unión a albúmina sérica de las bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), con polipéptidos derivados de CTLA-4 totalmente optimizados que idealmente consiguen valores de Kd de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

- Después de la identificación de los polipéptidos de CTLA-4 que se unen a albúmina sérica humana, dichos polipéptidos se usan para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

DOMINIOS DE TIPO V DE CTLA-4

CTLA-4 es un ejemplo de un ligando de no inmunoglobulinas que está unido a un partícipe de unión específico y comprende también dominios de tipo V. Estos dominios de tipo V se distinguen de los de anticuerpos o receptores

de linfocitos T porque no tienen propensión a unirse en moléculas de tipo Fv. Dicho ligando de no inmunoglobulinas proporciona un marco alternativo para el desarrollo de nuevos restos de unión con afinidades altas por moléculas diana. Por tanto, son deseables moléculas de unión de tipo V de dominio individual obtenidas de CTLA-4 que sean solubles.

- 5 El antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) interviene en la regulación de linfocitos T durante la respuesta autoinmunitaria. CTLA-4 es un homodímero de 44 kDa expresado principalmente y de forma transitoria en la superficie de linfocitos T activados, en los que interacciona con antígenos de superficie CD80 y CD86 en células de presentación de antígenos para efectuar la regulación de la respuesta autoinmunitaria (Waterhouse *et al.* 1996 *Immunol. Rev* 153: 183-207, van der Merwe *et al.* 1997 *J Exp Med* 185: 393-403). Cada subunidad monomérica de CTLA-4 consiste en un dominio extracelular en el extremo N, región transmembrana y dominio intracelular en el extremo C. El dominio extracelular comprende un dominio de tipo V en el extremo N (VLD; de aproximadamente 14 kDa de peso molecular predicho por homología con la superfamilia de las inmunoglobulinas) y un tallo de aproximadamente 10 residuos que conectan el VLD con la región transmembrana. El VLD comprende lazos de superficie que corresponden a CDR-1, CDR-2 y CDR-3 de un dominio V de anticuerpos (Metzler *et al.* 1997 *Nat Struct Biol* 4: 527-531). Recientes estudios estructurales y mutacionales sobre CTLA-4 indican que la unión a CD80 y CD86 tiene lugar mediante la superficie del VLD formada a partir de cadenas beta de tipo V A'GFCC' V y también de la secuencia MYPPPY altamente conservada en el lazo de superficie de tipo the CDR3 (Peach *et al.* 1994 *J Exp Med* 180: 2049-2058; Morton *et al.* 1996 *J. Immunol.* 156: 1047-1054; Metzler *et al.* 1997 *Nat Struct Biol* 4: 527-531). La dimerización entre monómeros de CTLA-4 tiene lugar a través de un enlace de disulfuro entre residuos de cisteína (CYS120) en los dos tallos, que produce la atadura de los dos dominios extracelulares, pero sin ninguna asociación directa aparente entre los dominios de tipo V (Metzler *et al.* 1997 *Nat Struct Biol* 4: 527-531).

- Previamente se ha demostrado que la sustitución de estructuras de lazo de CDR en los VLD lleva a la producción de moléculas monoméricas plegadas correctamente con especificidades de unión alteradas y solubilidad mejorada. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se genera un resto de unión que comprende al menos un dominio de tipo V monómero (VLD) derivado de CTLA-4, en donde el al menos un dominio de tipo V monómero se caracteriza porque al menos una estructura de lazo de CDR o parte de la misma está modificada o sustituida de manera que la solubilidad de la VLD modificada mejora cuando se compara con la VLD no modificada.

- En algunas realizaciones, al menos una estructura de lazo de CDR o parte de la misma se modifica o sustituye de manera que (i) el tamaño de la estructura de lazo de CDR se incrementa cuando se compara con la estructura de lazo de CDR correspondiente en el VLD no modificado; y/o (ii) la modificación o sustitución lleva a la formación de un enlace de disulfuro en o entre una o más de las estructuras de lazo de CDR.

- En la presente memoria se describe un resto de unión que comprende al menos un dominio de tipo V monomérico (VLD) derivado de CTLA-4, con el al menos un dominio de tipo V monomérico caracterizado porque al menos una estructura de lazo de CDR o parte de la misma se modifica o sustituye de manera que (i) el tamaño de la estructura de lazo de CDR se modifica cuando se compara con la estructura de lazo de CDR correspondiente en el VLD no modificado; y/o (ii) la modificación o sustitución lleva a la formación de un enlace de disulfuro en o entre una o más de las estructuras de lazo de CDR.

- El tamaño de la estructura de lazo de CDR puede incrementarse en al menos dos, más preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos seis y más preferiblemente al menos nueve residuos de aminoácidos. El resto de unión modificado puede mostrar también una afinidad de unión o especificidad alterada cuando se compara con el resto de unión no modificado. Preferiblemente, el efecto de sustituir o modificar la estructura de lazo de CDR es reducir o eliminar la afinidad del VLD en uno o más ligandos naturales del VLD no modificado. Preferiblemente, el efecto de sustituir o modificar la estructura de lazo de CDR es también cambiar la especificidad de unión del VLD (p. ej., para producir una composición que se une a albúmina sérica humana). Así, se prefiere que el VLD modificado esté unido a un partícipe de unión específico (p. ej., albúmina sérica humana) que sea diferente al del VLD no modificado.

La frase "VLD" pretende referirse a un dominio que tiene características estructurales similares al anticuerpo de cadena pesada variable (VH) o cadena ligera variable (VL). Estas características estructurales similares incluyen estructuras de lazo de CDR.

- 50 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "estructuras de lazo de CDR" se refiere a regiones o estructuras de lazo de polipéptidos de superficie como las regiones de determinación de complementariedad en dominios V de anticuerpos.

- Se observará que los restos de unión derivados de CTLA-4 pueden acoplarse entre sí, química o genéticamente, para formar reactivos multifuncionales o multivalentes. Por ejemplo, la adición de colas en el extremo C, como en el CTLA-4 natural con Cys 20, producirá un dímero. Los restos de unión también pueden acoplarse a otras moléculas para diversas formulaciones, que incluyen las que comprenden ligandos específicos dobles. Por ejemplo, los VLD de CTLA-4 pueden comprender una cola de polipéptidos en el extremo C o pueden acoplarse con estreptavidina o biotina. Los VLD de CTLA-4 pueden acoplarse también con radioisótopos, marcadores de tintes u otros reactivos de técnicas de imagen para la detección y/o localización *in vivo* de cánceres, coágulos sanguíneos, etc. Los VLD de

CTLA-4 también pueden inmovilizarse mediante acoplamiento en dispositivos insolubles y plataformas para aplicaciones diagnósticas o de biosensores.

Puede usarse el dominio de tipo V de CTLA-4 extracelular. Uno o más lazos de superficie del dominio de tipo V de CTLA-4 y preferiblemente las estructuras de lazo de CDR1, CDR2 o CDR3 se sustituyen por un polipéptido que tiene una afinidad de unión para albúmina sérica (por ejemplo, dominios CDR de dAb7h14 y secuencias derivadas de los mismos, como se ilustra más adelante). Se observará que estos VLD de CTLA-4 pueden ser poliespecíficos, teniendo afinidades dirigidas por sus superficies naturales y sus lazos de polipéptidos modificados.

Una o más de las estructuras de lazo de CDR del VLD de CTLA-4 pueden estar sustituidas por una o más estructuras de lazo de CDR derivadas de un anticuerpo. El anticuerpo puede obtenerse de cualquier especie. El anticuerpo puede obtenerse de ser humano, rata, ratón, camello, llama o tiburón. Las estructuras de lazo de CDR1 y CDR3 pueden adoptar conformaciones no canónicas que son extremadamente heterólogas de longitud. El dominio de tipo V puede poseer también un enlace de disulfuro que interconecta las estructuras de lazo de CDR1 y CDR3 (como se encuentra en algunos anticuerpos VHH de camello) o las estructuras de lazo de CDR2 y CDR3 (como se encuentra en algunos anticuerpos VHH de llama).

Para aplicaciones *in vivo* es preferible que los VLD sean homólogos para el sujeto de tratamiento o diagnóstico y que se eliminen los posibles xenoantígenos. Por consiguiente, se prefiere que las moléculas de VLD para su uso en aplicaciones clínicas sean sustancialmente homólogas a los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas humanas de ocurrencia natural.

La unión a albúmina sérica de polipéptidos de CTLA-4 (por ejemplo, VLD derivados de CTLA-4) puede optimizarse mediante la selección de un resto de unión con una afinidad por albúmina sérica, por ejemplo, que comprende el cribado de una biblioteca de polinucleótidos para la expresión de un resto de unión con una afinidad por albúmina sérica, en donde los polinucleótidos se han sometido a mutagénesis que lleva a una modificación o sustitución en al menos una estructura de lazo de CDR en al menos un VLD y en donde la solubilidad del VLD modificado aislado mejora cuando se compara con el VLD no modificado aislado.

Los expertos en la técnica observarán que dentro del contexto de dicho método de cribado de afinidad, puede usarse cualquier método de mutagénesis aleatoria o direccionada para introducir modificaciones en los dominios de tipo V. La mutagénesis puede ser mutagénesis direccionada. Opcionalmente, la mutagénesis direccionada implica la sustitución de al menos una secuencia dentro de al menos una estructura de lazo de CDR usando, por ejemplo, tecnología de PCR de superposición y empalme u otra.

Los expertos en la técnica observarán también que la biblioteca de polinucleótidos puede contener secuencias que codifican VLD que comprenden estructuras de lazo de CDR que son sustancialmente idénticas a las estructuras de lazo de CDR presentes en las inmunoglobulinas de ocurrencia natural y/o secuencias que codifican VLD que comprenden estructuras de lazo de CDR de ocurrencia no natural. Opcionalmente, el proceso de cribado implica la presentación de dominios de tipo V modificados como fusiones de proteínas del gen III en la superficie de las partículas de bacteriófagos.

La biblioteca puede comprender vectores de bacteriófagos como pHFA, fd-tet-dog o pFAB.5c que contienen los polinucleótidos que codifican los dominios de tipo V. El proceso de cribado puede implicar también la presentación de los dominios de tipo V modificados en un sistema de selección de presentación ribosómica.

Las moléculas de unión a albúmina sérica derivadas de CTLA-4 proporcionan las siguientes ventajas (i) el uso de una proteína humana natural elimina la necesidad de una posterior humanización de la molécula recombinante, una etapa que se requiere a menudo para la protección frente a la respuesta del sistema inmunitario si se usa en tratamientos humanos; (ii) el dominio es monomérico naturalmente como se describió anteriormente (la incorporación del residuo Cys120 en una cola en el extremo C lleva a la producción de una molécula dimérica); y (iii) las modificaciones estructurales han producido niveles de expresión mejorados de *E. coli*.

La determinación inicial de la estructura de CTLA-4 natural permitió la modelización y la predicción de las regiones correspondientes a las regiones de anticuerpos CDR 1, 2 y 3. Se propuso que estas zonas podrían ser sensibles a la mutación o la sustitución sin un efecto sustancial en el marco molecular y que por ello permitirían la expresión de una molécula plegada correctamente. La estructura de CTLA-4 publicada (Metzler *et al.* 1997 *Nat Struct Biol* 4: 527-531) demostró la precisión de estas predicciones, a pesar de la separación inesperada de CDR1 del ligando-sitio de unión, y de la flexión extensa de CDR3 para formar una superficie plana contigua con la cara de unión del ligando.

Los dominios de tipo V proporcionan un marco básico para la construcción de moléculas de dominios individuales solubles, en los que la especificidad de unión de la molécula puede diseñarse mediante la modificación de las estructuras de lazo de CDR. Los residuos de marco básicos del dominio de tipo V pueden modificarse de acuerdo con características estructurales presentes en anticuerpos de camélidos. Las inmunoglobulinas de cadena pesada de camellos difieren de las estructuras de anticuerpos "convencionales" en que consisten en cadenas VHH, (Hamers-Casterman *et al.* 1993 *Nature* 363: 446-448). Los anticuerpos de camélidos consisten en dos cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende un dominio V_HH. Varias características especiales permiten que estos anticuerpos superen el doble problema de la solubilidad y de la incapacidad de presentar una superficie de unión a

antígeno suficientemente grande.

En primer lugar, varias sustituciones no convencionales (predominantemente de naturaleza hidrófoba o polar) en residuos marco expuestos reducen la superficie hidrófoba, mientras mantienen la estructura marco de hoja beta interna (Desmyter *et al.* 1996 *Nat Struct Biol* 3:803-811). Además, en los tres lazos de CDR varias características estructurales compensan la pérdida de superficie de unión a antígeno proporcionada normalmente por el dominio VL. Mientras que el lazo CDR2 no difiere extensamente de otros dominios VH, los lazos CDR1 y CDR3 adoptan conformaciones no canónicas que son extremadamente heterólogas en longitud. Por ejemplo, el lazo H1 puede contener en cualquier lugar entre 2-8 residuos en comparación con los cinco habituales en moléculas Ig. Sin embargo, es el lazo de CDR3 el que muestra la máxima variación: en 17 secuencias de anticuerpos de camello referidas, la longitud de esta región varía entre 7 y 21 residuos (Muyldermans *et al.* 1994 *Protein Eng* 7: 1129-1135). En tercer lugar, muchos dominios VHH de camélidos poseen un enlace de disulfuro que interconecta CDR1 y CDR3 en el caso de camellos y que interconecta CDR1 y CDR2 en el caso de llamas (Vu *et al.* 1997 *Molec. Immunol.* 34: 1121-113). La función de esta característica estructural parece ser mantener la estabilidad del lazo y proporcionar una conformación de lazo más contorneada, distinta de la plana, que permita la unión a bolsas dentro del antígeno y que proporcione un área superficial aumentada. Sin embargo, no todos los anticuerpos de camélidos poseen este enlace de disulfuro, lo que indica que no es un requisito estructural absoluto.

También se describe un método para generar y seleccionar moléculas de VLD individuales con nuevas afinidades de unión para moléculas diana (por ejemplo, albúmina sérica humana). Este método implica la aplicación de técnicas de evolución molecular bien conocidas para polipéptidos derivados de CTLA-4. El método puede implicar la producción de bibliotecas de presentación de fagos o ribosómicas para el cribado de grandes números de derivados polipeptídicos mutados de CTLA-4.

Los genomas de bacteriófagos fd filamentosos están diseñados de manera que los fagos presenten, en su superficie, proteínas como las proteínas de tipo Ig (scFv, Fabs) que son codificadas por el ADN que está contenido dentro del fago (Smith, 1985 *Science* 228: 1315-1317; Huse *et al.* 1989 *Science* 246: 1275-81; McCafferty *et al.*, 1990 *Nature* 348: 552-4; Hoogenboom *et al.*, 1991 *Nucleic Acid Res.* 19: 4133-4137). Las moléculas de proteínas pueden presentarse en la superficie del bacteriófago Fd, acopladas de forma covalente con las proteínas de recubrimiento de fagos codificadas por el gen III, o menos frecuentemente con el gen VIII. La inserción de genes de anticuerpos en la proteína de recubrimiento del gen III proporciona la expresión de 3-5 moléculas de proteínas recombinantes por fagos, situados en los extremos. En cambio, la inserción de genes de anticuerpo en el gen VIII tiene la posibilidad de mostrar aproximadamente 2.000 copias de la proteína recombinante por partícula de fago, aunque este es un sistema multivalente que podría enmascarar la afinidad de una proteína individual presentada. También se usan vectores de fagémidos Fd, dado que pueden cambiarse fácilmente a partir de la presentación de fragmentos funcionales de tipo Ig en la superficie de bacteriófago fd para secretar fragmentos solubles de tipo Ig en *E. coli*. Las fusiones de proteínas recombinantes presentadas por fagos con el extremo N de la proteína de recubrimiento del gen III se hacen posibles mediante un codón ámbar colocado estratégicamente entre los dos genes de proteínas. En las cepas supresoras de codón ámbar de *E. coli*, las fusiones de gen III de dominio Ig resultantes se anclan en el recubrimiento del fago.

Puede aplicarse un proceso de selección basado en la afinidad de proteínas a cualquier reactivo de unión de alta afinidad como anticuerpos, antígenos, receptores y ligandos (véase, por ejemplo, Winter y Milstein, 1991 *Nature* 349: 293-299, cuyo contenido completo se incorpora en la presente memoria como referencia). Así, la selección de la proteína de unión de máxima afinidad presentada en el bacteriófago se acopla con la recuperación del gen que codifica esa proteína. Un fago de presentación de armazón de Ig o no Ig puede seleccionarse por afinidad mediante la unión a partículas de unión semejantes acoplados de forma covalente con perlas o adsorbidos en superficies plásticas de una forma similar a ELISA o a radioinmunoensayos en fase sólida. Aunque casi cualquier superficie de plástico adsorberá los antígenos de proteínas, se han formulado algunos productos comerciales especialmente para este fin, como los inmunotubos Nunc.

Las bibliotecas de presentación ribosómicas implican polipéptidos sintetizados *de novo* en sistemas de traducción sin células y presentados en la superficie de ribosomas con fines de selección (Hanes y Pluckthun, 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4937- 4942; He y Taussig, 1997 *Nucl. Acids Res.* 25: 5132-5134). El "sistema de traducción sin células" comprende ribosomas, enzimas solubles requeridas para síntesis de proteínas (normalmente de la misma célula que los ribosomas), ARN de transferencia, trifosfato de adenosina, trifosfato de guanosina, un sistema regenerador de trifosfato de ribonucleósido (como piruvato de fosfoenol y piruvato cinasa) y las sales y el tampón requeridos para sintetizar una proteína codificada por un ARNm exógeno. La traducción de polipéptidos puede realizarse en condiciones que mantengan los polisomas intactos, es decir, en la que los ribosomas, la molécula de ARNm y los polipéptidos traducidos estén asociados en un único complejo. Esto conduce en la práctica a la "presentación de ribosomas" del polipéptido traducido. Para la selección, los polipéptidos traducidos, en asociación con el complejo de ribosomas correspondiente, se mezclan con una molécula diana (por ejemplo, albúmina sérica) que está unida a una matriz (por ejemplo, Dynabeads). Los ribosomas que presentan los polipéptidos traducidos se unirán a la molécula diana y estos complejos pueden seleccionarse y el ARNm reamplificarse usando RT-PCR.

Aunque existen varias estrategias alternativas para modificar las moléculas de unión, la estrategia general para todas las proteínas presentadas se guía por un patrón en el que los reactivos de unión individuales se seleccionan

entre bibliotecas de presentación por afinidad a su ligando y/o receptor semejante. Los genes que codifican estos reactivos son modificados por una cualquiera o una combinación de una serie de estrategias de mutación *in vivo* e *in vitro* y se construye como una nueva reserva génica para la presentación y selección de las moléculas de máxima unión de afinidad.

5 LIPOCALINAS

Ejemplo 19: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas de lipocalinas de unión a albúmina sérica por medio de la selección de restos de unión a albúmina sérica

La proteína de unión bilina (BBP), una lipocalina obtenida de *Pieris brassicae* puede remodelarse mediante diseño de proteínas combinatorio de manera que reconozca una albúmina sérica humana. Para este fin, la BBP natural se somete a selección de bibliotecas y, opcionalmente, maduración de afinidad con el fin de producir moléculas BBP de unión a albúmina sérica humana para su uso en los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria.

La capacidad de una BBP natural de unirse a albúmina sérica humana se determina inicialmente por medio de un ensayo Biacore, como se describe más adelante para polipéptidos derivados de CTLA-4. (Un experto en la técnica reconocerá que la afinidad de unión puede evaluarse usando cualquier método apropiado, lo que incluye, por ejemplo, precipitación de albúmina sérica humana etiquetada, ensayo Biacore competitivo, etc.). Después de la detección de afinidad de unión nula o baja (por ejemplo, valores de Kd en el intervalo de μM o superior) de BBP para albúmina sérica humana, se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para impartir propiedades de unión a albúmina sérica humana a BBP, lo que incluye uno o más de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

La unión a albúmina sérica humana de BBP y polipéptido o polipéptidos derivados de BBP se consigue y se optimiza mediante métodos mutagénicos, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o como se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptido de BBP se someten a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza sobre todo el polipéptido de BBP (o derivado de BBP) y/o se realiza en secuencias específicas dentro del polipéptido de BBP, que incluye 16 residuos de aminoácidos identificados como residentes en el centro del sitio de unión a BPP natural, que está formado por cuatro lazos en la parte superior de un barril beta de ocho cadenas (Beste *et al.* 1999 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 1898-903). Opcionalmente, dichos procedimientos de mutagénesis se aleatorizan con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados de unión a albúmina sérica humana; y pueden realizarse múltiples tandas de mutagénesis durante el proceso de creación de una BBP que esté unida óptimamente a albúmina sérica humana. La PCR se usa opcionalmente para realizar métodos de mutagénesis, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias a través de secuencias dirigidas dentro de los polipéptidos de BBP (o derivados de BBP). (Estas estrategias son similares a las descritas más adelante para generación de bibliotecas de dAb). Además de métodos aleatorios de mutagénesis, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en la que la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos de polipéptidos de BBP (o derivados de BBP) que serán fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.

Los polipéptidos de BBP (o derivados de BBP) diseñados como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos de BBP que están optimizados para la unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas de BBP mutagenizadas, dicha biblioteca de polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren la unión a albúmina sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para la selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza con respecto a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsso *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), con los polipéptidos derivados de BPP totalmente optimizados y que idealmente alcanzan valores de Kd de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

Después de la identificación de los polipéptidos de BBP que se unen a albúmina sérica humana, dichos polipéptidos se usan a continuación para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Proteínas de armazón de lipocalinas

Las lipocalinas (Pervaiz y Brew, *FASEB J.* 1 (1987), 209-214) forman una familia de pequeñas proteínas secretoras, a menudo monoméricas, que se han aislado de diversos organismos, y cuya función fisiológica consiste en el almacenamiento o transporte de diferentes ligandos así como en funciones biológicas más complejas (Flower, *Biochem. J.* 318 (1996), 1-14). Las lipocalinas muestran una semejanza de secuencias mutua relativamente escasa y su pertenencia a la misma familia estructural de proteínas fue determinada por primera vez mediante análisis de la estructura por rayos X (Sawyer *et al.*, *Nature* 327 (1987), 659).

La primera lipocalina de estructura espacial conocida fue la proteína de unión a retinol, Rbp, que realiza el transporte

de vitamina A hidrosoluble en el suero sanguíneo (Newcomer *et al.*, *EMBO J.* 3 (1984), 1451-1454). Poco después, se determinó la estructura terciaria de la proteína de unión a bilina, Bbp, a partir de la mariposa *Pieris brassicae* (Huber *et al.*, *J. Mol. Biol.* 195 (1987), 423-434). Las características estructurales esenciales de esta clase de proteínas se ilustran en la estructura espacial de esta lipocalina. El elemento central en la arquitectura de plegamiento de las lipocalinas es una estructura en hoja plegada en β cilíndrica, denominada barril β , que está formada por hasta ocho cadenas β antiparalelas dispuestas de forma casi circular.

Este elemento estructural supersecundario puede verse también como una disposición de tipo "sándwich" de dos estructuras de hoja β de cuatro cadenas. Los elementos estructurales adicionales son un segmento extendido en el extremo amino de la cadena de polipéptidos y una hélice α cerca del extremo carboxi, que se sigue de un segmento extendido. Sin embargo, estas características adicionales no se revelan necesariamente en todas las lipocalinas. Por ejemplo, una parte importante del segmento en el extremo N está omitida en la proteína de unión de ácido retinoico del epidídimo (Newcomer, *Structure* (1993) 1: 7-18). También se conocen elementos estructurales peculiares adicionales, como, por ejemplo, anclajes de membrana (Bishop y Weiner, *Trends Biochem. Sci.* (1996) 21: 127) que están presentes solo en ciertas lipocalinas.

El barril β está cerrado en un extremo por un empaquetamiento denso de aminoácidos así como por segmentos de lazos. En el otro extremo, el barril β forma una bolsa de unión en la que el ligando respectivo de la lipocalina forma un complejo. Existen ocho cadenas β antiparalelas vecinas conectadas en forma de pares respectivos por flexiones de tipo horquilla en la cadena de polipéptidos que, junto con los aminoácidos adyacentes, están situadas todavía parcialmente en la región de la estructura de hoja plegada β cilíndrica, cada una de las cuales forma un elemento de lazo. La bolsa de unión para los ligandos está formada en total por estos cuatro lazos peptídicos. En el caso de Bbp, biliverdina IXy forma complejo en esta bolsa de unión. Otro ligando típico para las lipocalinas es la vitamina A en el caso de Rbp así como la β -lactoglobulina (Papiz *et al.*, *Nature* 324 (1986), 383-385).

Como se describe, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. nº 20060058510, pueden usarse miembros de la familia de polipéptidos de las lipocalinas para producir una clase de moléculas denominadas "anticalinas" diseñadas para reconocer nuevos ligandos mediante la mutación de aminoácidos que están situados en la región de los cuatro lazos peptídicos al final de la estructura en hoja plegada β cilíndrica, y que se caracterizan porque se unen a ligandos dados (p. ej., albúmina sérica humana) con una afinidad que puede determinarse.

Los sitios de unión a ligandos de las lipocalinas tienen una construcción más sencilla que los de las inmunoglobulinas. Los polipéptidos de lipocalinas comprenden solo un anillo de 8 cadenas β antiparalelas: el barril β . Esta estructura en hoja plegada β cíclica se conserva en el plegamiento de proteínas de las lipocalinas. El sitio de unión se forma en la región de entrada del barril β mediante los cuatro lazos peptídicos, cada uno de los cuales se conecta con dos cadenas β vecinas entre sí. Estos lazos peptídicos pueden variar significativamente en su estructura entre los miembros individuales de la familia de las lipocalinas.

Para usar un polipéptido de lipocalinas como un almacén de no inmunoglobulinas, se somete a mutagénesis uno o más de los cuatro lazos peptídicos que forman el sitio de unión a ligando de una lipocalina, seguido por la elección, es decir, la selección de aquellas variantes de proteínas (muteínas), que muestran la actividad deseada de unión para un ligando dado. Las muteínas de lipocalina obtenidas de esta forma se han denominado "anticalinas".

Los cuatro lazos peptídicos de las lipocalinas que, durante la producción de anticalinas, se modifican en su secuencia por mutagénesis, se caracterizan por aquellos segmentos en la secuencia polipeptídica lineal de BBP que comprenden las posiciones de aminoácidos 28 a 45, 58 a 69, 86 a 99 y 114 a 129 de Bbp. Cada uno de estos segmentos de secuencias comienza antes del extremo C de una de las cadenas β conservadas en el lado abierto del barril β , incluye la horquilla peptídica real y termina después del extremo N de la cadena β conservada de forma análoga que sigue en la secuencia.

Las alineaciones de secuencias o las superposiciones estructurales permiten asignar las posiciones de secuencias dadas para Bbp a las otras lipocalinas. Por ejemplo, las alineaciones de secuencias correspondientes a la alineación publicada de Peitsch y Boguski (*New Biologist* 2 (1990), 197-206) revelan que los cuatro lazos peptídicos de ApoD incluyen las posiciones de aminoácidos 28 a 44, 59 a 70, 85 a 98 y 113 a 127. También es posible identificar los lazos peptídicos correspondientes en las nuevas lipocalinas que son adecuados para mutagénesis de la misma forma.

En algunos casos, la relativamente débil homología de secuencias de las lipocalinas puede ser problemática en la determinación de las cadenas β conservadas. Por tanto es crucial que la secuencia polipeptídica sea capaz de formar la estructura de hoja plegada β cíclica formada por 8 cadenas β antiparalelas. Esto puede determinarse empleando métodos de análisis estructural como cristalografía de proteínas o espectroscopia por resonancia magnética nuclear multidimensional.

En las lipocalinas no Bbp, como, por ejemplo, ApoD o Rbp, los segmentos de secuencias adecuados para mutagénesis pueden ser fácilmente más largos o más cortos que los de Bbp basándose en la estructura variable individualmente de los lazos peptídicos. Puede ser incluso ventajoso modificar adicionalmente la longitud de segmentos de secuencias por delección o inserción de uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, estas

posiciones de aminoácidos que corresponden a las posiciones de secuencias 34 a 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125, y 127 de Bbp están mutadas. De forma correspondiente, en el caso de ApoD, las posiciones de secuencias 34 a 37, 59, 61, 70, 87, 89, 92, 94, 96, 113, 115, 123 y 125 se prefieren para la mutagénesis. Sin embargo, para la producción de anticalinas, no todas las posiciones de secuencias enumeradas anteriormente
5 deben someterse a mutagénesis.

Otras lipocalinas son adecuadas también como estructura subyacente para la producción de anticalinas. Preferiblemente, se usan las lipocalinas Rbp, Bbp o ApoD, que en la actualidad se han estudiado ya exhaustivamente de forma bioquímica. Se prefiere especialmente el uso de lipocalinas de origen humano para la producción de anticalinas. Esto se aplica especialmente cuando se pretende una aplicación de la anticalina o
10 anticalinas resultantes para seres humanos dado que, por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*, debe esperarse un efecto inmunógeno mínimo en comparación con las lipocalinas de otros organismos. Sin embargo, otras lipocalinas así como lipocalinas que, posiblemente, estén pendientes de descubrir pueden demostrar ser especialmente ventajosas para la producción de anticalinas. Pueden usarse también proteínas artificiales con un elemento de plegamiento que es equivalente estructuralmente al barril β de las lipocalinas.

15 Preferiblemente las moléculas de anticalinas descritas en la presente memoria deben poder unirse al ligando deseado (p. ej., albúmina sérica humana) con una afinidad que puede determinarse, es decir, con una afinidad constante de al menos 10^5 M^{-1} . Afinidades inferiores a este valor en general ya no pueden medirse exactamente con los métodos comunes y por tanto tienen una importancia secundaria para aplicaciones prácticas. Se prefieren especialmente las anticalinas que se unen al ligando deseado con una afinidad de al menos 10^6 M^{-1} , que
20 corresponde a una constante de disociación para el complejo de $1 \mu\text{M}$. La afinidad de unión de una anticalina al ligando deseado puede ser medida por la persona experta en la técnica mediante multitud de métodos, por ejemplo por valoración por fluorescencia, por ELISA de competencia o por la técnica de resonancia por plasmones superficiales.

La lipocalina ADNc, que puede ser producida y clonada por la persona experta en la técnica por métodos conocidos,
25 puede servir como un punto de partida para mutagénesis del lazo peptídico, como se describió por ejemplo para Bbp (Schmidt y Skerra, *Eur. J. Biochem.* 219 (1994), 855-863). Alternativamente, también puede emplearse ADN genómico para síntesis génica o puede aplicarse una combinación de estos métodos. Para la mutagénesis de los aminoácidos en los cuatro lazos peptídicos, la persona experta en la técnica tiene a su disposición los diversos métodos conocidos para mutagénesis dirigida al sitio o para mutagénesis por medio de la reacción en cadena de la
30 polimerasa. El método de mutagénesis puede caracterizarse, por ejemplo, porque para la introducción de las mutaciones pueden usarse mezclas de oligodesoxinucleótidos sintéticos, que llevan una composición de bases degenerada en las posiciones deseadas. La implementación de los bloques constituyentes de los nucleótidos con especificidad de pares de bases reducida, como por ejemplo inosina, es también una opción para la introducción de mutaciones en el segmento de secuencias o las posiciones de aminoácidos elegidos. El procedimiento para
35 mutagénesis de sitios de unión a ligandos se simplifica en comparación con los anticuerpos, dado que para las lipocalinas solo deben manipularse para este fin cuatro segmentos de secuencias, en lugar de seis, lo que corresponde a los cuatro lazos peptídicos citados anteriormente.

En los métodos de mutagénesis aleatoria dirigida al sitio que implementa oligodesoxinucleótidos sintéticos, las posiciones de aminoácidos relevantes en la estructura de las lipocalinas que deben mutarse pueden determinarse
40 con antelación. La selección ideal de las posiciones de aminoácidos que se mutarán puede depender por una parte de la lipocalina usada, y por otra del ligando deseado (p. ej., albúmina sérica humana). Puede ser útil mantener el número total de posiciones mutadas de aminoácidos en un único experimento en valores suficientemente bajos para que la colección de variantes obtenidas por mutagénesis, es decir, la denominada biblioteca, puede en su totalidad o, al menos en una selección representativa de la misma, realizarse lo más completamente posible en su
45 complejidad combinatoria, no solo en el nivel de los ácidos nucleicos codificantes, sino también en el nivel de los productos génicos.

Es posible elegir las posiciones de los aminoácidos que serán mutados de forma significativa especialmente cuando existe información estructural relativa a la lipocalina en sí que se utilizará, como es el caso de BBP y Rbp o al menos relativa a una lipocalina con una estructura similar, como por ejemplo en el caso de ApoD. El conjunto de posiciones
50 de aminoácidos elegidas puede depender además de las características del ligando deseado. Puede ser también ventajoso excluir las posiciones de aminoácidos individuales en la región de la bolsa de unión a ligandos a partir de la mutagénesis si, por ejemplo, demuestran ser esenciales para la eficacia del plegamiento o la estabilidad del plegamiento de las proteínas. Se describen métodos basados en oligonucleótidos específicos de la mutagénesis de la lipocalina, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. n.º 20060058510, cuyo contenido completo se incorpora en la
55 presente memoria como referencia.

Después de expresar las secuencias codificantes de ácidos nucleicos sometidos a mutagénesis, los clones que transportan la información genética para anticalinas que se unen a un ligando dado (p. ej., albúmina sérica humana) pueden seleccionarse entre los diferentes clones de la biblioteca obtenidos. Para la selección de estos clones pueden aplicarse las estrategias de expresión y las estrategias de selección elegidas. Se han descrito métodos de
60 este tipo en el contexto de la producción o el diseño de fragmentos de anticuerpos recombinantes, como la técnica de "presentación de fagos" o los métodos de "cribado de colonias" (Skerra *et al.*, *Anal. Biochem.* 196 (1991), 151-155).

Se encuentran descripciones de técnicas de "presentación de fagos", por ejemplo, en Hoess, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993), 572-579; Wells y Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992), 597-604; y Kay *et al.*, *Phage Display of Peptides and Proteins--A Laboratory Manual* (1996), Academic Press. Brevemente, en una realización de ejemplo, se producen fósidos que efectúan la expresión del gen estructural mutado de la lipocalina como una proteína de fusión con una secuencia de señal en el extremo N, preferiblemente la secuencia de señal OmpA, y con la proteína de recubrimiento pIII del fago M13 (Model y Russel, en "The Bacteriophages", Vol. 2 (1988), Plenum Press, Nueva York, 375-456) o fragmentos de esta proteína de recubrimiento, que se incorporan en el recubrimiento del fago, en el extremo C. Para producir las proteínas de fusión se usa preferiblemente el fragmento en el extremo C ApIII de la proteína de recubrimiento de fago, que contiene solo los aminoácidos 217 a 406 de la proteína de recubrimiento pIII natural. Se prefiere especialmente un fragmento en el extremo C a partir de pIII en el que el residuo de cisteína en la posición 201 está ausente o sustituido por otro aminoácido. La descripción adicional de los métodos de presentación de fagos, los métodos de selección, etc., que pueden aplicarse a las lipocalinas en producción de "anticalinas" que poseen propiedades de unión específicas se detallan, por ejemplo, en publicación de EE.UU. n° 20060058510, cuyo contenido completo se incorpora en la presente memoria como referencia.

Pueden identificarse y producirse anticalinas, por ejemplo, usando los métodos descritos anteriormente, que posean alta afinidad por un ligando dado (p. ej., albúmina sérica humana). Pueden conseguirse constantes de unión a ligandos de más de 10^6 M^{-1} para anticalinas, incluso en casos donde un nuevo ligando no comporte una relación estructural en ningún modo con biliverdina IXy, el ligando original de Bbp (puede consultarse la publicación de EE.UU. n° 20060058510). Estas afinidades para ligandos nuevos que pueden conseguirse con las anticalinas son comparables con las afinidades que son conocidas para anticuerpos de la respuesta inmunitaria secundaria. Además, existe la posibilidad de someter las anticalinas producidas a mutagénesis aleatoria adicional opcionalmente parcial con el fin de seleccionar variantes de afinidad todavía más alta a partir de la nueva biblioteca así obtenida. Ya se han descrito los procedimientos correspondientes para el caso de fragmentos de anticuerpos recombinantes con fines de "maduración de afinidad" (Low *et al.*, *J. Mol. Biol.* 260 (1996), 359-368; Barbas y Burton, *Trends Biotechnol.* 14 (1996), 230-234) y también pueden aplicarse a las anticalinas de una forma correspondiente por la persona experta en la técnica.

Proteína estafilocócica A (SPA)/Affibody

Ejemplo 20: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas Affibody (proteína estafilocócica A (SPA)) de unión a albúmina sérica por medio de selección de restos de unión a albúmina sérica

El dominio Z de proteína estafilocócica A (SPA) se somete a técnicas de selección de bibliotecas y, opcionalmente, de maduración de afinidad con el fin de producir moléculas de armazón de no inmunoglobulinas derivado de SPA de unión a albúmina sérica humana (denominadas "moléculas affibody") para su uso en los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria.

Se realiza un análisis de unión en tiempo real por Biacore para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a polipéptido de SPA inmovilizado. (Un experto en la técnica reconocerá que la afinidad de unión puede valorarse usando cualquier método apropiado, que incluye, p. ej., precipitación de albúmina sérica humana etiquetada, ensayo Biacore competitivo, etc.). Después de la detección de afinidad de unión nula o baja (por ejemplo, valores de Kd en el intervalo de μM o superior) de un polipéptido de SPA inalterado para albúmina sérica humana, se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para impartir propiedades de unión a albúmina sérica humana al polipéptido de SPA, que incluyen uno o más de los métodos siguientes diseñados para impartir y/o mejorar la afinidad de unión de la molécula para el antígeno diana.

La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos de armazón de SPA se consigue y se optimiza mediante métodos mutagénicos, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptidos de armazón de SPA se someten a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza sobre todo en el dominio Z del polipéptido de SPA o sobre secuencias específicas dentro del polipéptido de SPA, por ejemplo, sobre 13 residuos de superficie accesibles para disolventes del dominio Z como se identifica en Nord *et al.* (1997 *Nat. Biotechnol.* 15: 772-77), y opcionalmente se aleatoriza con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados de unión a albúmina sérica humana. Opcionalmente se usa PCR para realizar estos métodos de mutagénesis, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias en secuencias dirigidas en los polipéptidos de SPA. (estas estrategias son similares a las descritas más adelante para generación de bibliotecas de dAb). Además de métodos aleatorios de mutagénesis, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en donde la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos de polipéptido de SPA que son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana. En algunas realizaciones, se ensamblan y se insertan repertorios de genes de dominios Z mutantes en un vector de fagémidos adaptado para presentación de fagos monovalente. Las bibliotecas que comprenden, p. ej., millones de transformantes, se construyen usando, p. ej., degeneración de NN(G/T) o (C/A/G)NN alternativa para mutagénesis.

Los polipéptidos de SPA diseñados como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar dichos polipéptidos de SPA que se optimizan para la unión a albúmina sérica

humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas de SPA mutagenizadas, dicha biblioteca de polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren unión a albúmina sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para la selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Se realiza bioseparación mediante adsorción frente a la proteína de albúmina sérica humana diana para conseguir un enriquecimiento significativo de moléculas de SPA de unión a albúmina sérica. Los clones seleccionados se expresan posteriormente en *E. coli* y se analizan por SDS-PAGE, espectroscopia de dicroísmo circular y estudios de unión a albúmina sérica humana por análisis de interacción biospecífico. Se prevé que las moléculas de SPA (moléculas affibody) que se unen a albúmina sérica humana tienen una estructura secundaria similar al dominio Z natural y tienen constantes de disociación micromolares (Kd) para sus dianas respectivas en el intervalo de μM o mejor (p. ej., nM o pM).

Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), donde los polipéptidos derivados de SPA totalmente optimizados alcanzan idealmente valores de Kd de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

Después de la identificación de los polipéptidos de SPA que se unen a albúmina sérica humana, dichos polipéptidos se usan para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Polipéptidos de moléculas Affibody de proteína estafilocócica A (SPA)

Las superficies expuestas a disolventes de receptores bacterianos pueden ser direccionadas por mutagénesis aleatoria seguido por selección fenotípica con el fin de impartir, p. ej., la afinidad de unión para albúmina sérica a dichas moléculas de receptor. Dichas proteínas pueden ser anormalmente estables, lo que las hace adecuadas para diversas aplicaciones (Alexander *et al.* (1992) *Biochemistry* 31: 3597-3603). En particular, para receptores bacterianos que contienen estructuras en grupos helicoidales, puede esperarse que la conformación sea tolerante a los cambios en las cadenas laterales de residuos no participantes en las interfaces de empaquetamientos en hélice. Son ejemplos de dichas moléculas el relativamente pequeño (58 residuos) dominio de unión B a IgG de proteína estafilocócica A (SPA) y el análogo sintético de dominio B, denotado como dominio Z (Nilsson *et al.* (1987) *Protein Engineering* 1: 107-113).

El dominio Z derivado de SPA es el principal dominio de SPA usado como armazón para construir variantes de dominios con nuevas propiedades de unión (consúltese, p. ej., los documentos WO-00/63243 y WO-95/19374, incorporados en la presente memoria como referencia en su totalidad). El dominio Z de SPA es un dominio de grupos de triple hélice sin cisteína de 58 residuos de aminoácidos que se emplea como armazón para la construcción de bibliotecas de fagémidos combinatorias a partir de las cuales se seleccionan variantes que se dirigen a moléculas deseadas (p. ej., albúmina sérica humana) usando tecnología de presentación de fagos (Nilsson *et al.* 1987 *Protein Eng.* 1: 107-113; Nord *et al.* 1997 *Nat. Biotechnol.* 15: 772-777; Nord *et al.* 2000 *J. Biotechnol.* 80: 45-54; Hansson *et al.* 1999 *Inmunotechnology* 4: 237-252; Eklund *et al.*, 2002 *Proteins* 48: 454-462; Rönnmark *et al.* 2002 *Eur. J. Biochem.* 269: 2647-2655). Dichas variantes de unión a diana, denominadas moléculas "affibody", se seleccionan como ligandos de proteínas diana por presentación de fagos de bibliotecas combinatorias donde se han aleatorizado normalmente 13 cadenas laterales en la superficie de las hélices 1 y 2 (Q9, Q10, N11, F13, Y14, L17, H18, E24, E25, R27, N28, Q32 y K35) en el dominio Z (Lendel *et al.* 2006 *J. Mol. Biol.* 359: 1293-304). La sencilla y robusta estructura de dichas moléculas affibody, junto con su bajo peso molecular (7 kDa), las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones. Se ha demostrado una eficacia documentada en bioseparaciones a escala de bioproceso y de laboratorio (Nord *et al.* 2000 *J. Biotechnol.* 80: 45-54; Nord *et al.* 2001 *Eur. J. Biochem.* 268: 4269-4277; Gråslund *et al.* 2002 *J. Biotechnol.* 99: 41-50), y se han obtenido resultados prometedores al evaluar ligandos de moléculas affibody como reactivos de detección (Karlström y Nygren 2001 *Anal. Biochem.* 295: 22-30; Rönnmark *et al.* 2002 *J. Immunol. Methods* 261: 199-211), para diseñar tropismo adenovirico (Henning *et al.* 2002 *Hum. Gene Ther.* 13: 1427-1439) y para inhibir interacciones del receptor (Sandström *et al.* 2003 *Protein Eng.* 16: 691-697). Así, los ligandos de moléculas affibody diseñados que, p. ej., se unen a albúmina sérica humana son componentes deseables de ciertas composiciones de ligandos específicos dobles de la presente invención.

Las bibliotecas de polipéptidos obtenidas del dominio Z de proteína estafilocócica A pueden generarse mediante cualquier método de mutagénesis como se conoce en la técnica y/o como se describe más adelante. Después de la creación de dichas bibliotecas de polipéptidos, pueden seleccionarse e identificarse eficientemente variantes capaces de unión a moléculas diana deseadas (p. ej., albúmina sérica humana) usando, por ejemplo, tecnologías de selección *in vitro* como presentación de fagos (Dunn 1996; Smith y Patrenko 1997; Hoogenboom *et al.* 1998), péptidos de presentación ribosómica (Hanes y Pluckthun 1997; He y Taussig 1997) en plásmidos (Schatz 1993) o presentación bacteriana (Georgiou *et al.* 1997). Para dichas selecciones, se ha considerado teóricamente una correlación entre el tamaño de biblioteca (complejidad) y la probabilidad de aislar ligandos de afinidades más elevadas ($KD = 10^{-8}$ M o menos) (Perelson y Oster 1979) y se ha demostrado experimentalmente (Griffiths *et al.* 1994; Vaughan *et al.* 1996; Aujame *et al.* 1997).

Las moléculas affibody tienen varias ventajas con respecto a los anticuerpos tradicionales, por ejemplo (i) un menor

coste de fabricación; (ii) menor tamaño; (iii) aumento de la estabilidad y la robustez; y (iv) capacidad de producirse recombinantemente en un hospedador bacteriano, o por síntesis química, que obvia el riesgo de contaminación vírica.

Una molécula affibody es un polipéptido que es un derivado de un dominio de proteína estafilocócica A (SPA), siendo dicho dominio de SPA el dominio B o Z, en donde se ha sustituido una serie de residuos de aminoácidos por otros residuos de aminoácidos, realizándose dicha sustitución sin pérdida sustancial de la estructura básica y la estabilidad de dicho dominio SPA, y produciendo dicha sustitución una capacidad de interacción de dicho polipéptido con al menos un dominio de antígeno diana (p. ej., albúmina sérica humana). El número de residuos de aminoácidos sustituidos podría ser de 1 a aproximadamente 30, o de 1 a aproximadamente 13. Otros posibles intervalos son de 4 a aproximadamente 30; de 4 a aproximadamente 13; de 5 a aproximadamente 20, o de 5 a aproximadamente 13 residuos de aminoácidos. La persona experta comprenderá, p. ej., según Nord *et al.* 1997 *Nat. Biotechnol.* 15: 772-777, que los residuos amino preferiblemente situados en la superficie del dominio Z puede ser sustituida, mientras que el núcleo del grupo debería mantenerse constante para conservar las propiedades estructurales de la molécula.

Se expone un procedimiento para la fabricación de una molécula affibody, p. ej., en el documento WO-00/63243, y para los fines de la presente invención podría implicar, p. ej., las etapas siguientes: (i) presentación, p. ej. por presentación de fagos (para revisión, véase, p. ej., Kay, K. *et al.* (eds). *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, ISBN 0-12-4023 80-0), presentación ribosómica (para revisión, véase p. ej. Hanes, J. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14130-14135) o presentación de células (para revisión, véase p. ej. Daugherty, P.S. *et al.* (1998) *Protein Eng.* 11: 825-832), variantes de polipéptidos de una biblioteca de proteínas que comprende un repertorio de variantes de polipéptidos derivado del dominio SPA B o Z; (ii) selección de clones que expresan polipéptidos que se unen a albúmina sérica humana; y (iii) producción por expresión recombinante de los clones seleccionados o por síntesis química.

Avímero

Ejemplo 21: Generación de ligando específico doble que comprende un avímero de unión a albúmina sérica por medio de injerto CDR

Los dominios CDR de dAb7h14 se emplean para construir un polipéptido de avímero que se une a albúmina sérica humana de la siguiente manera. Las secuencias CDR1 (RASQWIGSQLS; SEQ ID NO.:___), CDR2 (WRSSLQS; SEQ ID NO.:___), y CDR3 (AQGAALPRT ; SEQ ID NO.:___) de dAb7h14 se injertan en un monómero C2 (descrito en la publicación de patente de EE.UU. n° 2005/0221384, incorporado en la presente memoria como referencia en su totalidad) en los residuos 17-28, 49-53 y 78-85, respectivamente, que constituyen las regiones de lazo 1, 2 y 3, respectivamente del monómero C2. El análisis de unión en tiempo real por Biacore se realiza para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a polipéptido de monómero derivado de C2 inmovilizado que comprende los dominios de CDR de anti-albúmina sérica humana de dAb7h14. (Un experto en la técnica reconocerá que la afinidad de unión puede valorarse usando cualquier método apropiado, que incluye, p. ej., precipitación de albúmina sérica humana etiquetada, ensayo de Biacore competitivo, etc.). Si se detecta una afinidad por albúmina sérica humana baja o nula (p. ej., valores de K_d en el intervalo de μM o superior), se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para mejorar las propiedades de unión a albúmina sérica humana del monómero C2 injertado en CDR (y/o de dímeros de avímero, trímeros y otras composiciones de iteración de orden superior), que incluye cualquiera de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

La longitud o longitudes de regiones injertadas con CDR dAb7h14 del polipéptido monomérico C2 inicial (y/o de polipéptidos de avímero dímero, trímero, etc., producidos de forma iterativa) correspondientes a regiones de lazo expuestas a disolventes en el monómero C2 nativo (y/o en otros monómeros nativos usados en las composiciones de avímero) se ajustan a través del uso de polipéptidos del grupo enlazador. Por ejemplo, la secuencia peptídica CDR2 de nueve residuos de aminoácidos de dAb7h14 puede extenderse a 13 residuos de aminoácidos de longitud usando grupos enlazadores de aminoácidos de, p. ej., cero a cuatro residuos de longitud situados en uno y/o los dos flancos en el extremo N o C de la secuencia polipeptídica CDR3 dAb7h14, consiguiendo así una longitud de secuencia peptídica injertada total de 13 aminoácidos en el dominio con injerto de CDR3 correspondiente al lazo 3 del polipéptido monomérico C2. Dicho uso de polipéptido o polipéptidos de grupo enlazador se combina opcionalmente con mutagénesis de las secuencias del grupo enlazador, las secuencias CDR y/o las secuencias polipeptídicas monoméricas C2 no CDR (p. ej., usando procedimientos de optimización mutagénicos como se describe más adelante), con el fin de mejorar la capacidad de unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos monoméricos C2 injertados con CDR (p. ej., mediante optimización de las secuencias polipeptídicas de monómero C2 y CDR en los polipéptidos monoméricos C2 injertados con CDR). Los grupos enlazadores polipeptídicos empleados para este fin poseen una secuencia predeterminada, u, opcionalmente, se seleccionan entre una población de secuencias de grupo enlazador polipeptídicas aleatorizadas mediante la valoración de las capacidades de unión a albúmina sérica humana de polipéptidos monoméricos C2 injertados con CRD que contienen grupo enlazador. Los métodos de optimización se realizan en paralelo y/o iterativamente. Los procesos de optimización en paralelo e iterativos (p. ej., maduración de afinidad) emplean métodos de selección como se describe más adelante y/o como se conoce en la técnica como útiles para la optimización de las propiedades de unión a polipéptidos.

- La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos monoméricos C2 injertados con CDR (y/o composiciones de orden superior producidas iterativamente de dímero, trímero, etc., de avímeros, o monómeros adicionales individuales que contribuyen a las mismas) que presentan CDR dAb7h14 se optimiza mediante mutagénesis, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o se conoce por otros medios en la técnica. Para el polipéptido de armazón monomérico C2 de ejemplo, los dominios que rodean a las secuencias polipeptídicas CDR dAb7h14 injertadas se someten a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza opcionalmente en la secuencia polipeptídica del monómero C2 sobre residuos de aminoácidos seleccionados como se indica, p. ej., en la publicación de patente de EE.UU. nº 2005/0221384, o se realiza opcionalmente en todos los residuos de aminoácidos no CDR, y opcionalmente se aleatoriza con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados de unión a albúmina sérica humana. Opcionalmente, los dominios de polipéptidos de CDR dAb7h14 presentados en el polipéptido monomérico C2 injertado con CDR se someten a mutagénesis mediante, p. ej., mutagénesis aleatoria, mutagénesis NNK, mutagénesis de revisión y/u otro método reconocido por la técnica. La PCR se usa opcionalmente para realizar dichos métodos de mutagénesis, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias a través de secuencias direccionadas en los polipéptidos monoméricos C2 injertados con CDR. Estas estrategias son similares a las descritas más adelante para la generación de bibliotecas de dAb. Además de los métodos de mutagénesis aleatoria y/o de revisión, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en donde la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos que son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.
- 20 Los polipéptidos monoméricos C2 (y/o composiciones de avímeros producidas iterativamente que comprenden monómeros individuales) que comprenden secuencias de CDR dAb7h14 CDR injertadas como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos monoméricos C2 (y composiciones de avímeros) que están optimizados para la unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas monoméricas C2 injertadas con CDR dAb7h14, esta biblioteca de dichos polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren la unión a albúmina sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para la selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), con avímeros totalmente optimizados que comprenden monómeros derivados de C2 que consiguen idealmente valores de Kd de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

Tras la identificación de polipéptidos derivados de monómeros C2 que se unen a albúmina sérica humana, las propiedades de la unión sérica humana de dichos monómeros iniciales puede mejorarse además mediante la combinación de dichos monómeros con otros monómeros, seguido por mutagénesis y/o selección adicional, formando así una composición de avímeros que posee afinidad específica para albúmina sérica humana. Después de la identificación de una composición de avímeros que posee afinidad por albúmina sérica humana, se usan dichos polipéptidos de avímeros para generar composiciones de ligandos específicos dobles mediante cualquiera de los métodos descritos más adelante.

- 40 Ejemplo 22: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas de avímeros de unión a albúmina sérica por medio de la selección de restos de unión a albúmina sérica

El polipéptido monomérico C2 natural tal como se indica se somete a técnicas de selección de bibliotecas y, opcionalmente, de maduración de afinidad, y a continuación se combina con un monómero adicional (p. ej., un monómero de fibronectina, para el que la afinidad a albúmina sérica humana opcionalmente puede optimizarse en paralelo) y opcionalmente se somete iterativamente a técnicas de selección de bibliotecas y, opcionalmente, de maduración de afinidad con el fin de producir una molécula de armazón de no inmunoglobulinas de avímero de unión a albúmina sérica humana para su uso en el específico doble descrito en la presente memoria.

El análisis de unión en tiempo real por Biacore se realiza para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a un polipéptido monomérico C2 inmovilizado (y/o una molécula de avímero producida iterativamente). Después de la detección de afinidad de unión nula o baja (p. ej., valores de Kd en el intervalo de μM o superior) de un polipéptido monomérico C2 para albúmina sérica humana, se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para impartir propiedades de unión a albúmina sérica humana al polipéptido monomérico C2, que incluye uno o más de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos monoméricos C2 (y/o moléculas de dímero, trímero, etc., de avímero producidas iterativamente) se consigue y se optimiza mediante métodos mutagénicos, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptidos monoméricos C2 se someten a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza sobre la totalidad del polipéptido monomérico C2 o sobre secuencias específicas en el polipéptido monomérico C2 sobre residuos de aminoácidos seleccionados como se indica, p. ej., en la publicación de patente de EE.UU. nº 2005/0221384, y se aleatoriza opcionalmente con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados

de unión a albúmina sérica humana. La PCR se usa opcionalmente para realizar dichos métodos de mutagénesis, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias a través de secuencias direccionadas en las moléculas de polipéptidos monoméricos C2 y/o avímeros. (Estas estrategias son similares a las descritas más adelante para generación de bibliotecas de dAb). Además de métodos aleatorios de mutagénesis, se emplea mutagénesis dirigida
5 de residuos de aminoácidos direccionados en donde la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos de moléculas de monómero C2 y/o avímero que son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.

Los polipéptidos monoméricos C2 diseñados como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellas moléculas de polipéptidos monoméricos C2 y/o avímeros que
10 están optimizadas para unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas de monómeros C2 mutagenizados, dicha biblioteca de polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren unión a albúmina sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, las tandas de selección pueden incluir iteraciones dentro de las cuales se añaden subunidades
15 adicionales de monómeros para formar una nueva molécula de avímero. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), con avímeros totalmente optimizados que comprenden polipéptidos monoméricos derivados de C2 que consiguen idealmente valores de Kd de afinidad de
20 unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

Tras la identificación de polipéptidos derivados de monómeros C2 que se unen a albúmina sérica humana, las propiedades de unión a suero humano de dichos monómeros iniciales pueden mejorarse aún más mediante la combinación de dichos monómeros con otros monómeros, seguido por mutagénesis y/o selección adicionales, formando así una composición de avímeros que posee afinidad específica para albúmina sérica humana. Después
25 de la identificación de una composición de avímeros que posee afinidad por albúmina sérica humana, dichos polipéptidos de avímeros se usan para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Producción y uso de polipéptidos de avímeros

Los avímeros se hacen evolucionar a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos por barajado de exones in vitro y presentación de fagos, lo que genera proteínas multidominio con propiedades de
30 unión y/o inhibitoras. La unión de múltiples dominios de unión independientes (seleccionados, p. ej., de forma iterativa para la unión a una proteína diana, p. ej., albúmina sérica humana) crea avidéz y lleva a una mejora de la afinidad y la especificidad en comparación con proteínas de unión a un solo epítipo convencionales. Otras ventajas potenciales incluyen la producción sencilla y eficiente de moléculas específicas de dianas múltiples en *E. coli*, la
35 mejora de la termoestabilidad y la resistencia a las proteasas. Pueden producirse avímeros que posean afinidades inferiores a nM frente a una proteína diana. Por ejemplo, se ha producido un avímero que inhibe la interleucina 6 con CI_{50} 0,8 pM en ensayos basados en células y se ha caracterizado como biológicamente activo (Silverman *et al.* 2005 Nature Biotechnology 23: 1556-1561; véanse también, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. publicadas nº 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0053973 y 2005/0089932, 2005/0048512, y 2004/0175756, todas las cuales
40 se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad).

La síntesis de avímeros implica bibliotecas de presentación de fagos derivadas del repertorio humano de dominios A. La recombinación sintética se emplea para crear una reserva muy diversa de monómeros, como se describe en Silverman *et al.* (2005 Nature Biotechnology 23: 1556-1561). Después de la generación de una reserva de
45 monómeros, se criba la reserva con respecto a una proteína diana (p. ej., albúmina sérica humana). Se identifican los candidatos iniciales, y se añade un monómero adicional y se criba la biblioteca de dímeros resultante con respecto a la proteína diana para identificar dímeros candidatos de unión a diana. A continuación se itera el método para obtener un trímero con afinidad de unión muy alta para la proteína diana, y, opcionalmente, puede iterarse adicionalmente para identificar complejos candidatos de orden superior. Los complejos candidatos que se identifican para unión con alta afinidad y especificidad a proteínas diana se denominan avímeros (por "multímero de avidéz").

50 Los dominios monoméricos de avímeros pueden ser cadenas de polipéptidos de cualquier tamaño. Por ejemplo, los dominios monoméricos pueden tener de aproximadamente 25 a aproximadamente 500, de aproximadamente 30 a aproximadamente 200, de aproximadamente 30 a aproximadamente 100, de aproximadamente 90 a aproximadamente 200, de aproximadamente 30 a aproximadamente 250, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60, de aproximadamente 9 a aproximadamente 150, de aproximadamente 100 a
55 aproximadamente 150, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 aminoácidos. Análogamente, un dominio monomérico de un avímero puede comprender, p. ej., de aproximadamente 30 a aproximadamente 200 aminoácidos; de aproximadamente 25 a aproximadamente 180 aminoácidos; de aproximadamente 40 a aproximadamente 150 aminoácidos; de aproximadamente 50 a aproximadamente 130 aminoácidos; o de aproximadamente 75 a aproximadamente 125 aminoácidos. Los dominios
60 monoméricos y los inmunodominios pueden mantener normalmente una conformación estable en solución. En ocasiones, los dominios monoméricos de avímeros y los inmunodominios pueden plegarse independientemente en

una conformación estable. La conformación estable puede estabilizarse mediante iones metálicos. La conformación estable puede contener opcionalmente enlaces de disulfuro (p. ej., al menos uno, dos, o tres o más enlaces de disulfuro). Los enlaces de disulfuro pueden formarse opcionalmente entre dos residuos de cisteína.

Las publicaciones que describen dominios monoméricos y proteínas de mosaico y las referencias citadas en las mismas incluyen las siguientes: Hegyi, H y Bork, P. 1997 *J. Protein Chem.*, 16: 545-551; Baron *et al.* 1991 *Trends Biochem. Sci.* 16: 13-17; Ponting *et al.* 2000 *Adv. Protein Chem.* 54: 185-244; Doolittle 1995 *Annu. Rev. Biochem.* 64: 287-314; Doolittle y Bork 1993 *Scientific American* 269: 50-6; y Bork 1991 *FEBS Letters* 286: 47-54. Los dominios monoméricos usados en avímeros pueden incluir también los dominios presentes en la base de datos Pfam y la base de datos SMART. Véase Schultz *et al.* 2000 *Nucleic Acid Res.* 28: 231-34.

10 Los dominios monoméricos que son especialmente adecuados para su uso en composiciones de avímeros son (1) dominios β en sándwich; (2) dominios β en barril; o (3) dominios ricos en cisteína que comprenden enlaces de disulfuro. Los dominios ricos en cisteína empleados en avímeros normalmente no forman una estructura de hélice α , hoja β o barril β . Normalmente, los enlaces de disulfuro promueven el plegamiento del dominio en una estructura tridimensional. Normalmente, los dominios ricos en cisteína tienen al menos dos enlaces de disulfuro, más
15 normalmente al menos tres enlaces de disulfuro.

Los dominios monoméricos de avímeros pueden tener cualquier número de características. Por ejemplo, los dominios pueden tener inmunogenicidad baja o inexistente en un animal (p. ej., un ser humano). Los dominios pueden tener un tamaño pequeño, por ejemplo, los dominios pueden ser suficientemente pequeños para penetrar en la piel u otros tejidos. Los dominios pueden poseer un intervalo de semividas o estabildades *in vivo*.

20 Los dominios monoméricos ilustrativos adecuados para su uso en composiciones de avímeros incluyen, p. ej., un dominio de tipo EGF, un dominio de Kringle, un dominio de tipo I de fibronectina, un dominio de tipo II de fibronectina, un dominio de tipo III de fibronectina, un dominio PAN, un dominio Gla, un dominio SRCR, un dominio de Kunitz/inhibidor de tripsina pancreática bovina, un dominio inhibidor de la serina proteasa de tipo Kazal, un dominio (de tipo P) de trébol, un dominio de tipo C del factor de von Willebrand, un dominio de tipo anafilatoxina, un
25 dominio CUB, una repetición de tipo I de tiroglobulina, un dominio de clase de receptor LDL, un dominio de Sushi, un dominio de Link, un dominio de tipo I de trombospondina, un dominio monomérico de tiroglobulina, un dominio de tipo inmunoglobulina, un dominio de lectina de tipo C, un dominio MAM, un dominio de tipo de factor de von Willebrand, un dominio de somatomedina B, un dominio central de cuatro disulfuros de tipo WAP, un dominio F5/8 de tipo C, un dominio de hemopexina, un dominio SH2, un dominio SH3, un dominio de tipo EFG de tipo laminina, un
30 dominio C2 y otros de los dominios conocidos para los expertos en la técnica, así como derivados y/o variantes de los mismos. La publicación de patente de EE.UU. nº 20050221384 presenta diagramas esquemáticos de diversas formas de ejemplo de dominios monoméricos presentes en las moléculas en la familia de receptores LDL.

Los dominios monoméricos adecuados (p. ej., dominios con la capacidad de plegarse independientemente o con asistencia limitada) pueden seleccionarse entre las familias de dominios de proteínas que contienen estructuras tridimensionales β en sándwich o en barril β como se define mediante herramientas de análisis de secuencias computacional como Simple Modular Architecture Research Tool (SMART; véase Shultz *et al.* 2000 *Nucleic Acids Research* 28: 231-234) o CATH (véase Pearl *et al.* 2000 *Nucleic Acids Research* 28: 277-282). Los dominios monoméricos de avímeros de ejemplo incluyen también dominios de fibronectina tipo III, un dominio de anticalina y un dominio de tipo Ig de CTLA-4. Se describen algunos aspectos de estos dominios en los documentos WO-
40 01/64942 de Lipovsek *et al.*, WO99/16873 de Beste *et al.* y WO-00/60070 de Desmet *et al.*

Los dominios monoméricos de avímeros son opcionalmente ricos en cisteína. Los dominios monoméricos ricos en cisteína incluyen, por ejemplo, el dominio de receptor LDL de clase A ("dominio A") o el dominio de tipo EGF. Los dominios monoméricos pueden tener también un grupo de residuos cargados negativamente. Opcionalmente, los dominios monoméricos contienen una secuencia repetida, como YWTD como se encuentra en el dominio propulsor
45 β . Otro dominio monomérico de ejemplo adecuado para su uso en avímeros es el dominio C2. Se presentan secuencias de ejemplo de dominio A y dominio C2 y secuencias de consenso útiles en la producción de avímeros, que incluyen las selecciones de ejemplo de residuos de aminoácidos (p. ej., residuos de lazo expuestos a la superficie) más deseables para direccionamiento mutagénico, en la publicación de patente de EE.UU. nº 2005/0221384.

50 Los polinucleótidos (también referidos como ácidos nucleicos) que codifican los dominios monoméricos se emplean normalmente para preparar dominios monoméricos mediante expresión. Los ácidos nucleicos que codifican dominios monoméricos pueden obtenerse de diversas fuentes diferentes. Las bibliotecas de dominios monoméricos pueden prepararse mediante la expresión de una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos que codifican dominios monoméricos de ocurrencia natural, dominios monoméricos alterados (es decir, variantes de dominios
55 monoméricos), o una combinación de los mismos.

Los dominios monoméricos que se unen a un ligando seleccionado o deseado (p. ej., albúmina sérica humana) o mezcla de ligandos se identifican opcionalmente como una etapa inicial en la producción de avímeros. En algunas realizaciones, los dominios monoméricos y/o inmunodominios se identifican o seleccionan para una propiedad deseada (p. ej., la afinidad de unión para albúmina sérica humana) y después los dominios monoméricos y/o

inmunodominios se forman en multímeros. Para dichas realizaciones puede usarse cualquier método que produzca la selección de dominios con una propiedad deseada (p. ej., unión a albúmina sérica humana). Por ejemplo, los métodos pueden comprender el suministro de una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos, codificando cada ácido nucleico un dominio monomérico; traduciendo la pluralidad de diferentes ácidos nucleicos, proporcionando así una pluralidad de diferentes dominios monoméricos; cribando la pluralidad de diferentes dominios monoméricos para la unión del ligando o mezcla de ligandos deseados; e identificando los miembros de la pluralidad de diferentes dominios monoméricos que se unen al ligando o mezcla de ligandos deseados.

Los dominios monoméricos para producción de avímeros pueden ser de ocurrencia natural o alterados (variantes no naturales). La expresión "de ocurrencia natural" se emplea en la presente memoria para indicar que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, los dominios monoméricos naturales pueden incluir dominios monoméricos humanos u opcionalmente, dominios derivados de diferentes especies o fuentes, p. ej., mamíferos, primates, roedores, peces, aves, reptiles, plantas, etc. Los dominios monoméricos de ocurrencia natural pueden obtenerse mediante diversos métodos, p. ej., por amplificación PCR de ADN genómico o ADNc. El término "natural", como se emplea en la presente memoria, se usa en referencia a un ácido nucleico y/o polipéptido que no ha sido alterado mediante mutagénesis u otras técnicas por medio de la realización de cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Los dominios monoméricos de avímeros pueden ser dominios de ocurrencia natural o variantes de ocurrencia no natural. Las bibliotecas de dominios monoméricos empleadas en la síntesis de avímeros pueden contener dominio monomérico de ocurrencia natural, variantes de dominios monoméricos de ocurrencia no natural o una combinación de los mismos.

Puede usarse una diversidad de vectores o sistemas de presentación de información para expresar ácidos nucleicos que codifican dominios monoméricos y avímeros, y para probar una actividad deseada (p. ej., unión a albúmina sérica humana). Por ejemplo, un sistema de presentación de fagos es un sistema en el que los dominios monoméricos se expresan como proteínas de fusión en la superficie del fago (Pharmacia, Milwaukee Wis). La presentación de fagos puede comportar la presentación de una secuencia polipeptídica que codifica dominios monoméricos y/o inmunodominios en la superficie de bacteriófagos filamentosos, normalmente como fusión con una proteína de recubrimiento de bacteriófago. Se indican métodos de ejemplo de enriquecimiento de la afinidad y presentación de fagos, por ejemplo, en las publicaciones de patente PCT nº 91/17271, 91/18980 y 91/19818 y 93/08278.

Los ejemplos de otros sistemas de presentación incluyen presentaciones de ribosomas, una presentación ligada a nucleótidos (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 6.281.344; 6.194.550, 6.207.446, 6.214.553 y 6.258.558), las presentaciones de superficie celular y similares. Las presentaciones de superficie celular incluyen diversas células, p. ej., *E. coli*, levaduras y/o células de mamífero. Cuando se emplea una célula como presentación, los ácidos nucleicos, p. ej., obtenidos por amplificación mediante PCR seguido por digestión, se introducen en la célula y se traducen. Opcionalmente, pueden introducirse polipéptidos que codifican dominios monoméricos o avímeros, p. ej., por inyección, en la célula.

Como se describe más adelante y en la técnica, los avímeros son composiciones multiméricas. En realizaciones de ejemplo, los multímeros comprenden al menos dos dominios monoméricos y/o inmunodominios. Por ejemplo, los multímeros pueden comprender de 2 a aproximadamente 10 dominios monoméricos y/o inmunodominios, de 2 a aproximadamente 8 dominios monoméricos y/o inmunodominios, de aproximadamente 3 y aproximadamente 10 dominios monoméricos y/o inmunodominios, aproximadamente 7 dominios monoméricos y/o inmunodominios, aproximadamente 6 dominios monoméricos y/o inmunodominios, aproximadamente 5 dominios monoméricos y/o inmunodominios, o aproximadamente 4 dominios monoméricos y/o inmunodominios. En algunas realizaciones, el multímero comprende al menos 3 dominios monoméricos y/o inmunodominios. Normalmente, los dominios monoméricos han sido preseleccionados para la unión a la molécula diana de interés (p. ej., albúmina sérica humana).

Dentro de un avímero, cada dominio monomérico puede unirse específicamente a una molécula diana (p. ej., albúmina sérica humana). Opcionalmente, cada monómero está unido en una posición diferente (de manera análoga a un epítipo) en una molécula diana. La unión de múltiples dominios monoméricos y/o inmunodominios a la misma molécula diana puede producir un efecto de avidéz que deriva en una potenciación de la avidéz del avímero multimérico para la molécula diana en comparación con cada monómero individual. Opcionalmente, el multímero puede poseer una avidéz de al menos aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50 o 100 veces la avidéz de un dominio monomérico en solitario para la proteína diana (p. ej., albúmina sérica humana).

Los dominios monoméricos seleccionados pueden unirse mediante un grupo enlazador para formar un multímero (avímero). Por ejemplo, se coloca un grupo enlazador entre cada dominio monomérico discreto separado en un multímero. Normalmente, los inmunodominios están también unidos entre sí o con dominios monoméricos por medio de un resto de grupo enlazador. Los restos de grupos enlazadores que pueden emplearse fácilmente para unir entre sí variantes de inmunodominios son los mismos que los descritos para variantes de multímeros de dominio monomérico. En la presente memoria se describen restos de grupos enlazadores de ejemplo adecuados para la unión de variantes de inmunodominios a otros dominios en multímeros.

La unión de dominios monoméricos seleccionados mediante un grupo enlazador para formar un avímero puede realizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el conjunto combinatorio de polinucleótidos que codifica dominios monoméricos seleccionados puede conseguirse mediante ligamiento por ADN, u opcionalmente, por reacciones de superposición de autocebado basadas en PCR. El grupo enlazador puede unirse a un monómero antes de identificar el monómero en cuanto a su capacidad de unirse a un multímero diana o después de haber seleccionado el monómero por su capacidad de unirse a un multímero diana.

Como se menciona anteriormente, el o los polipéptidos que comprenden avímeros pueden alterarse. Las descripciones de una variedad de diversos procedimientos de generación para la generación de secuencias modificadas o alteradas de ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos se han descrito anteriormente y se describen a continuación en las siguientes publicaciones y en las referencias citadas en las mismas: Soong, N. *et al.*, Molecular breeding of viruses, (2000) *Nat Genet* 25(4):436-439; Stemmer, *et al.*, Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties, (1999) *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness *et al.*, DNA Shuffling of subgenomic sequences of subtilisin, (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang *et al.*, Evolution of a cytokine using DNA family shuffling, (1999) *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull and Stemmer, Protein evolution by molecular breeding, (1999) *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians *et al.*, Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling, (1999) *Nature Biotechnology* 17:259-264; Cramer *et al.*, DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution, (1998) *Nature* 391:288-291; Cramer *et al.*, Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling, (1997) *Nature Biotechnology* 15:436-438; Zhang *et al.*, Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten *et al.*, Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines, (1997) *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Cramer *et al.*, Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling, (1996) *Nature Medicine* 2:100-103; Cramer *et al.*, Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling, (1996) *Nature Biotechnology* 14:315-319; Gates *et al.*, Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer', (1996) *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer, Sexual PCR and Assembly PCR, (1996) In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp. 447-457; Cramer and Stemmer, Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes, (1995) *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer *et al.*, Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxy-ribonucleotides, (1995) *Gene*, 164:49-53; Stemmer, The Evolution of Molecular Computation, (1995) *Science* 270:1510; Stemmer, Searching Sequence Space, (1995) *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, (1994) *Nature* 370:389-391; and Stemmer, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Los métodos de mutaciones para la generación de diversidad incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Ling *et al.*, Approaches to DNA mutagenesis: an overview, (1997) *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale *et al.*, Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, (1996) *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith, In vitro mutagenesis, (1985) *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, (1985) *Science* 229:1193-1201; Carter, Site-directed mutagenesis, (1986) *Biochem. J.* 237:1-7; and Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, (1987) in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); mutagenesis using uracil containing templates (Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel *et al.*, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, (1987) *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; and Bass *et al.*, Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, (1988) *Science* 242:240-245); oligonucleotide-directed mutagenesis ((1983) *Methods in Enzymol.* 100: 468-500; (1987) *Methods in Enzymol.* 154: 329-350; Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, (1982) *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith, Oligonucleotide- directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, (1983) *Methods in Enzymol.* 100:468-500; and Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, (1987) *Methods in Enzymol.* 154:329-350); phosphorothioate-modified DNA mutagenesis (Taylor *et al.*, The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor *et al.*, The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787; Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers *et al.*, Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide- directed mutagenesis, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; and Sayers *et al.*, Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); mutagenesis using gapped duplex DNA (Kramer *et al.*, The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, (1984) *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, (1987) *Methods in Enzymol.* 154:350-367; Kramer *et al.*, Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; and Fritz *et al.*, Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999).

Los métodos adecuados adicionales incluyen reparación de ausencia de emparejamiento puntual (Kramer *et al.*, Point Mismatch Repair, (1984) Cell 38:879-887), mutagenesis using repair-deficient host strains (Carter *et al.*, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, (1985) Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; and Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, (1987) Methods in Enzymol. 154: 382-403), deletion mutagenesis (Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, (1986) Nucl. Acids Res. 14: 5115), restriction-selection and restriction-purification (Wells *et al.*, Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, (1986) Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423), mutagenesis by total gene synthesis (Nambiar *et al.*, Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, (1984) Science 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), (1988) Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells *et al.*, Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, (1985) Gene 34:315-323; and Grundstrom *et al.*, Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316), double-strand break repair (Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181; and Arnold, Protein engineering for unusual environments, (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455). Pueden encontrarse detalles adicionales de muchos de los métodos anteriores en Methods in Enzymology Volume 154, que también describe controles útiles para problemas de reparación con diversos métodos de mutagénesis.

Los detalles adicionales relativos a diversos métodos de generación de diversidad pueden encontrarse en las siguientes patentes de EE.UU., publicaciones y solicitudes PCT y publicaciones EPO: patente de EE.UU. n° 5.605.793 para Stemmer (Feb. 25, 1997), "Methods for In Vitro Recombination"; patente de EE.UU. n° 5.811.238 para Stemmer *et al.* (Sep. 22, 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; patente de EE.UU. n° 5.830.721 para Stemmer *et al.* (Nov. 3, 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; patente de EE.UU. n° 5.834.252 para Stemmer, *et al.* (Nov. 10, 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction"; patente de EE.UU. n° 5.837.458 para Minshull, *et al.* (Nov. 17, 1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; documento WO 95/22625, Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; documento WO 96/33207 para Stemmer and Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction"; documento WO 97/20078 para Stemmer and Cramer "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; documento WO 97/35966 para Minshull and Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; documento WO 99/41402 para Punnonen *et al.* "Targeting of Genetic Vaccine Vectors"; documento WO 99/41383 para Punnonen *et al.* "Antigen Library Immunization"; documento WO 99/41369 para Punnonen *et al.* "Genetic Vaccine Vector Engineering"; documento WO 99/41368 para Punnonen *et al.* "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines"; EP 752008 para Stemmer and Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; EP 0932670 para Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination"; documento WO 99/23107 para Stemmer *et al.*, "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling"; documento WO 99/21979 para Apt *et al.*, "Human Papillomavirus Vectors"; documento WO 98/31837 by del Cardayre *et al.* "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination"; documento WO 98/27230 para Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering"; documento WO 98/27230 para Stemmer *et al.*, "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection," WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries," WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences," WO 98/42832 para Arnold *et al.*, "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers," WO 99/29902 para Arnold *et al.*, "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences," WO 98/41653 para Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library," WO 98/41622 para Borchert *et al.*, "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling," and WO 98/42727 para Pati and Zaring, "Sequence Alterations using Homologous Recombination"; documento WO 00/18906 para Patten *et al.*, "Shuffling of Codon-Altered Genes"; documento WO 00/04190 para del Cardayre *et al.* "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Recombination"; documento WO 00/42561 para Cramer *et al.*, "Oligonucleotide Mediated Nucleic Acid Recombination"; documento WO 00/42559 para Selifonov and Stemmer "Methods of Populating Data Structures for Use in Evolutionary Simulations"; documento WO 00/42560 para Selifonov *et al.*, "Methods for Making Character Strings, Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics"; documento WO 01/23401 para Welch *et al.*, "Use of Codon-Variied Oligonucleotide Synthesis for Synthetic Shuffling"; y PCT/US01/06775 "Single-Stranded Nucleic Acid Template-Mediated Recombination and Nucleic Acid Fragment Isolation" para Affholter.

Los polipéptidos (p. ej., avímeros) pueden expresarse opcionalmente en células. Los dominios de multímeros pueden sintetizarse como una única proteína usando sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. Además de los numerosos textos indicados anteriormente, los textos generales que describen técnicas de biología molecular útiles en la presente memoria, que incluyen el uso de vectores, promotores y otros muchos temas relevantes para la expresión de ácidos nucleicos como dominios monoméricos, dominios monoméricos seleccionados, multímeros y/o multímeros seleccionados, incluyen Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning--A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ("Sambrook") and Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 1999) ("Ausubel"). Se

encuentran ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos en la técnica a través de métodos de amplificación *in vitro*, útiles para identificar el aislamiento y la clonación de dominios de monómeros y multímeros que codifican ácidos nucleicos, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de la replicasa Q y otras técnicas mediadas por ARN-polimerasa (p. ej., NASBA),
 5 en Berger, Sambrook, and Ausubel, así como en Mullis *et al.*, (1987) patente de EE.UU. n° 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.* eds) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (Oct. 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3, 81-94; (Kwoh *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173; Guatelli *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell *et al.* (1989) J. Clin. Chem 35, 1826; Landegren *et al.*, (1988) Science 241, 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8, 291-294;
 10 Wu and Wallace, (1989) Gene 4, 560; Barringer *et al.* (1990) Gene 89, 117, y Sooknanan and Malek (1995) Biotechnology 13: 563-564. Los métodos mejorados de clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro* se describen en Wallace *et al.*, patente de EE.UU. n° 5.426.039. Los métodos mejorados de amplificación de ácidos nucleicos grandes por PCR se resumen en Cheng *et al.* (1994) Nature 369: 684-685 y las referencias del mismo, en el que se generan amplicones de PCR de hasta 40 kb. Un experto observará que esencialmente cualquier ARN
 15 puede convertirse en un ADN bicatenario adecuado para digestión de restricción, expansión de PCR y secuenciación usando transcriptasa inversa y una polimerasa.

Pueden introducirse vectores que codifican, p. ej., dominios monoméricos y/o avímeros en células hospedadoras, producidos y/o seleccionados por técnicas recombinantes. Las células hospedadoras están diseñadas (es decir, transducidas, transformadas o transfectadas) con dichos vectores, que pueden ser, por ejemplo, un vector de
 20 clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula vírica, un fago, etc. Las células hospedadoras diseñadas pueden cultivarse en medios de nutrientes convencionales modificados según resulte apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar el gen o genes del dominio monomérico, el dominio monomérico seleccionado, el multímero y/o el multímero seleccionado de interés. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y similares, son las usadas anteriormente con la
 25 célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los expertos en la técnica y en las referencias citadas en la presente memoria, que incluyen, p. ej., Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3ª edición, Wiley-Liss, Nueva York y las referencias citadas en la misma.

Los polipéptidos pueden producirse también en células no animales como plantas, levaduras, hongos, bacterias y similares. De hecho, como se ha observado antes, la presentación de fagos es una técnica especialmente relevante
 30 para producir dichos polipéptidos. Además de en Sambrook, Berger y Ausubel, los detalles relativos al cultivo celular pueden encontrarse en Payne *et al.* (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, N.Y.; Gamborg y Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlín Heidelberg Nueva York) y Atlas y Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla.

Los avímeros pueden poseer alteraciones de dominios monoméricos, inmunodominios y/o multímeros que mejoran las propiedades farmacológicas, reducen la inmunogenicidad o facilitan el transporte del multímero y/o el dominio monomérico en una célula o tejido (p. ej., a través de la barrera hematoencefálica, o a través de la piel). Estos tipos de alteraciones incluyen diversas modificaciones (p. ej., adición de grupos de azúcares o glucosilación), la adición de PEG, la adición de dominios de proteínas que se unen a una cierta proteína (p. ej., HSA u otra proteína sérica), la
 40 adición de fragmentos o secuencias de proteínas que señalizan el movimiento o el transporte hacia, desde y a través de una célula. También pueden añadirse componentes adicionales a un multímero y/o dominio monomérico para manipular las propiedades del multímero y/o dominio monomérico. Pueden añadirse también diversos componentes que incluyen, p. ej., un dominio que se une a un receptor conocido (p. ej., un dominio de proteínas de región Fc que se une a un receptor Fc), una o varias toxinas o parte de una toxina, un prodominio que puede escindirse
 45 opcionalmente para activar el multímero o dominio monomérico, una molécula informadora (p. ej., proteína fluorescente verde), un componente que se une a la molécula informadora (como un radionúclido para radioterapia, biotina o avidina) o una combinación de modificaciones.

Como se emplea en la presente memoria, "evolución dirigida" se refiere un proceso por el cual se generan, se expresan o se criban variantes de polinucleótidos para una actividad (p. ej., un polipéptido con actividad de unión
 50 para una proteína diana de albúmina sérica humana diana) en un proceso recursivo. Se seleccionan uno o varios candidatos en el cribado y a continuación se repite el proceso usando polinucleótidos que codifican los candidatos seleccionados para generar nuevas variantes. La evolución dirigida implica al menos dos tandas de generación de variación y puede incluir 3, 4, 5, 10, 20 o más tandas de generación de variación y selección. La variación puede generarse mediante cualquier método conocido para los expertos en la técnica, lo que incluye, p. ej., PCR proclive a
 55 errores, barajado génico, mutagénesis química y similares.

El término "barajado" se emplea en la presente memoria para indicar una recombinación entre secuencias no idénticas. En algunas realizaciones, el barajado puede incluir el cruce por medio de recombinación homóloga o de recombinación no homóloga, por ejemplo, por medio de sistemas *cre/lox* y/o *flp/frt*. El barajado puede realizarse empleando una diversidad de formatos diferentes, que incluyen por ejemplo, formatos de barajado *in vitro* e *in vivo*,
 60 formatos de barajado *in silico*, formatos de barajado que usan moldes bicatenarios o monocatenarios, formatos de barajado basados en cebador, formatos de barajado basados en fragmentación de ácidos nucleicos y formatos de barajado mediados por oligonucleótidos, todos los cuales se basan en episodios de recombinación entre secuencias

no idénticas y se describen en más detalle o se hace referencia a ellos en la presente memoria más adelante, así como otros formatos similares basados en recombinación.

El término "aleatorio" como se emplea en la presente memoria se refiere a una secuencia de polinucleótidos o una secuencia de aminoácidos compuesta por dos o más aminoácidos y construida por un proceso estocástico o aleatorio. La secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos aleatoria puede incluir motivos de marco o armazón, que pueden comprender secuencias invariantes.

GroEL y GroES

Ejemplo 24: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas cpn10 (GroES) de unión a albúmina sérica medio de injerto de CDR

10 El dominio CDR3 de dAb7h14 se emplea para construir un polipéptido de armazón de no inmunoglobulinas cpn10 (GroES) que se une a albúmina sérica humana de la siguiente manera. La secuencia de CDR3 (AQQAALPRT ; SEQ ID NO.:__) de dAb7h14 se injerta en el polipéptido de cpn10 en sustitución de residuos de aminoácidos cpn10 naturales en las posiciones 19-27 (residuos de lazos móviles). El análisis de unión en tiempo real por Biacore se realiza para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a polipéptido derivado de cpn10
15 inmovilizado que comprende el dominio CDR de anti-albúmina sérica humana de dAb7h14. (Un experto en la técnica reconocerá que la afinidad de unión puede valorarse usando cualquier método apropiado, lo que incluye, p. ej., precipitación de albúmina sérica humana etiquetada, ensayo de Biacore competitivo, etc.). Si se detecta una afinidad por albúmina sérica humana baja o nula (p. ej., valores de Kd en el intervalo de μM o superior), se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para mejorar las propiedades de unión a albúmina sérica humana del polipéptido
20 de cpn10 injertado con CDR3, que incluye cualquiera de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

La longitud de la región injertada con CD3 de dAb7h14 del polipéptido de cpn10 correspondiente a la región de lazo móvil en los polipéptidos de cpn10 naturales se ajusta a través de la delección de residuos de aminoácidos y/o el uso de polipéptidos de grupos enlazadores. Por ejemplo, la secuencia peptídica CDR2 de nueve residuos de aminoácidos de dAb7h14 se extiende a 16 residuos de aminoácidos de longitud usando grupos enlazadores de aminoácidos de, p. ej., cero a siete residuos de longitud situados en los flancos del extremo N, C o ambos de la secuencia polipeptídica CDR dAb7h14, consiguiendo así una longitud total de la secuencia peptídica injertada de 16 aminoácidos en el dominio injertado con CDR3 correspondiente al lazo móvil en la secuencia cpn10 nativa. Dicho uso de polipéptido o polipéptidos de grupo enlazador se combina opcionalmente con la mutagénesis de las
25 secuencias de grupo enlazador, secuencia o secuencias de CDR3 y/o secuencias cpn10 de no CDR (p. ej., usando procedimientos de optimización mutagénicos como se describe más adelante), con el fin de mejorar la capacidad de unión a albúmina sérica humana de polipéptidos de cpn10 injertados con CDR3 (p. ej., mediante optimización de las secuencias de CDR y fibronectina en los polipéptidos de cpn10 injertados con CDR3). Los grupos enlazadores polipeptídicos empleados para este fin poseen una secuencia predeterminada, u, opcionalmente, se seleccionan
30 entre una población de secuencias polipeptídicas de grupos enlazadores aleatorizados mediante evaluación de las capacidades de unión a albúmina sérica humana de grupo enlazador que contiene polipéptidos de cpn10 injertados con CDR3. Los métodos de optimización se realizan en paralelo y/o iterativamente. Tanto los procesos de optimización en paralelo como los iterativos (p. ej., maduración de afinidad) emplean métodos de selección como se describe más adelante y/o como se conocen en la técnica útiles para la optimización de las propiedades de unión a
35 los polipéptidos.

La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos injertados con CDR que presentan CDR3 dAb7h14 se optimiza mediante mutagénesis, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptidos de armazón cpn10 que rodean a la secuencia polipeptídica de CDR3 dAb7h14 injertada se someten a mutagénesis
45 aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza en la secuencia polipeptídica cpn10 sobre residuos de aminoácidos no injertados, y opcionalmente se aleatoriza con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados de unión a albúmina sérica humana. Opcionalmente, el dominio de polipéptidos de CDR3 dAb7h14 presentados en el polipéptido de cpn10 injertado con CDR3 se somete a mutagénesis mediante, p. ej., mutagénesis aleatoria, mutagénesis NNK, mutagénesis de revisión y/u otro método
50 reconocido por la técnica. PCR se usa opcionalmente para realizar dichos métodos de mutagénesis, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias a través de secuencias direccionadas en los polipéptidos de cpn10 injertados con CDR3. Estas estrategias son similares a las descritas más adelante para generación de bibliotecas de dAb. Además de métodos de mutagénesis aleatoria y/o de revisión, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en donde la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos que
55 son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.

Los polipéptidos de cpn10 que comprenden secuencia de CDR3 dAb7h14 CDR3 injertada diseñados como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos de cpn10 que se optimizan para unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas cpn10 injertadas con CDR3 dAb7h14, esta biblioteca de
60 tales polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren unión a albúmina

sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore
5 (Uppsala, Suecia), con polipéptidos derivados de cpn10 monoméricos y/u oligoméricos totalmente optimizados que idealmente consiguen valores de Kd de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

Tras la identificación de polipéptidos derivados de cpn10 monoméricos que se unen a albúmina sérica humana, las propiedades de unión a suero humano de dichos monómeros iniciales pueden mejorarse aún más mediante la combinación de dichos monómeros con otros monómeros, seguido por mutagénesis y/o selección adicional, con lo
10 que se forma una composición oligomérica cpn10/GroES que posee afinidad específica para albúmina sérica humana. Después de la identificación de una composición oligomérica cpn10/GroES que posee afinidad por albúmina sérica humana, dichos polipéptidos se usan a continuación para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Ejemplo 25: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas cpn10 de
15 unión a albúmina sérica por medio de la selección de restos de unión a albúmina sérica

El polipéptido de cpn10 natural se somete a técnicas de selección de bibliotecas y, opcionalmente, de maduración de afinidad con el fin de producir moléculas de armazón de no inmunoglobulinas cpn10 de unión a albúmina sérica para su uso en ligandos específicos dobles.

La capacidad de un polipéptido de cpn10 natural de unirse a albúmina sérica humana se determina inicialmente
20 mediante ensayo Biacore como se describió anteriormente. Después de la detección de afinidad de unión nula o baja (p. ej., valores de Kd en el intervalo de μM o superior) de un polipéptido de cpn10 para albúmina sérica humana, se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para impartir las propiedades de unión a albúmina sérica humana al polipéptido de cpn10, que incluye uno o más de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos de armazón cpn10 se consigue y se optimiza
25 mediante métodos mutagénicos, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptidos de armazón cpn10 se someten a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza sobre la totalidad del polipéptido de cpn10 o sobre secuencias específicas en el polipéptido
30 de cpn10, que incluye residuos de lazos móviles de aminoácidos en las posiciones 19-27, y se aleatoriza opcionalmente con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados de unión a albúmina sérica humana. La PCR se usa opcionalmente para realizar dichos métodos de mutagénesis, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias a través de secuencias direccionadas en los polipéptidos de cpn10. (Estas estrategias son similares a las descritas más adelante para generación de bibliotecas de dAb). Además de métodos
35 aleatorios de mutagénesis, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en donde la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos de polipéptidos de cpn10 que son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.

Los polipéptidos de cpn10 diseñados como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos de cpn10 que están optimizados para unión a albúmina
40 sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas cpn10 mutagenizadas, dicha biblioteca de polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren unión a albúmina sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de
45 unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), con polipéptidos derivados de cpn10 monoméricos y/u oligoméricos totalmente optimizados que idealmente alcanzan valores de Kd de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

Tras la identificación de polipéptidos derivados de cpn10 monoméricos que se unen a albúmina sérica humana, las
50 propiedades de unión a suero humano de dichos monómeros iniciales pueden mejorarse aún más mediante la combinación de dichos monómeros con otros monómeros, seguido por mutagénesis y/o selección adicional, formando así una composición de cpn10/GroES oligomérica que posee afinidad específica por albúmina sérica humana. Después de la identificación de una composición de cpn10/GroES oligomérica que posee afinidad por albúmina sérica humana, dichos polipéptidos se usan para generar composiciones de ligandos específicos dobles
55 por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Polipéptidos GroEL

GroEL es una chaperona molecular clave en *E. coli* que consiste en 14 subunidades cada una de una masa molecular de 57,5 Kd dispuesta en dos anillos de siete eslabones (Braig *et al.* 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3978-

- 3982). Existe una gran cavidad en el sistema de anillos de GroEL, y según se cree de forma extendida la cavidad es necesaria para una actividad con éxito de plegamiento de proteínas. Para una actividad óptima, se requiere una co-chaperona, GroES, que consiste en un anillo de siete eslabones de subunidades de 10 Kd (Hunt *et al.* 1996 *Nature* 379: 37-45). Cada subunidad GroES usa un lazo móvil con un tripéptido hidrófobo conservado para la interacción
- 5 con GroEL (Landry *et al.* 1993 *Nature* 364: 255-258). Los lazos móviles tienen en general menos de 16 aminoácidos de longitud y experimentan una transición desde lazos desordenados en horquillas β concomitantes con la unión de los dominios apicales de GroEL (Shewmaker *et al.* 2001 *J. Biol. Chem.* 276: 31257-31264). La actividad del complejo GroEL/GroES requiere ATP. GroEL y GroES están extendidos en todos los organismos, y a menudo se refieren como moléculas de chaperonina (cpn), cpn60 y cpn10, respectivamente.
- 10 GroEL es una proteína alostérica. Las proteínas alostéricas forman una clase especial de proteínas oligoméricas, que alternan entre dos o más estructuras tridimensionales diferentes durante la unión de ligandos y sustratos. Las proteínas alostéricas intervienen a menudo en los procesos de control en biología o en los que se interconvierten formas de energía mecánicas y fisicoquímicas. La función del ATP es desencadenar este cambio alostérico, provocando la conversión de GroEL desde un estado que se une a proteínas fuertemente desnaturalizadas a
- 15 otro que se une a proteínas desnaturalizadas débilmente. La co-chaperona, GroES, ayuda en este proceso favoreciendo el estado de unión débil. También puede actuar como una tapa, cerrando la cavidad de GroEL. Además, su unión a GroEL es probable directamente para competir con la unión de sustratos desnaturalizados. El resultado neto es que la unión de GroES y ATP a GroEL que tiene un sustrato unido en su forma desnaturalizada libera el sustrato desnaturalizado en la cavidad o en solución en el que puede volverse a plegar.
- 20 GroEL y GroES son armazones de polipéptidos que pueden usarse para multimerizar polipéptidos o dominios de proteínas monoméricos, para producir proteínas multiméricas que tienen cualquier característica deseada. Como también se describe más adelante, p. ej., para composiciones de avímeros, a menudo es deseable multimerizar monómeros de polipéptidos.
- Muchas proteínas necesitan la asistencia de chaperonas moleculares para plegarse *in vivo* o volverse a plegar *in*
- 25 *vitro* con rendimientos altos. Las chaperonas moleculares son proteínas, que a menudo son grandes y necesitan una fuente de energía como ATP para funcionar. Una chaperona molecular clave en *E. coli* es GroEL, que consiste en 14 subunidades cada una de una masa molecular de 57,5 kDa dispuesta en dos anillos de siete eslabones. En el sistema de anillos de GroEL existe una gran cavidad, y según se cree de forma extendida la cavidad es necesaria para una actividad de plegamiento con éxito. Para una actividad óptima, se necesita una co-chaperona, GroES, que
- 30 consiste en un anillo de siete eslabones de subunidades de 10 kDa. La actividad del complejo GroEL/GroES requiere ATP como fuente de energía.
- Las minichaperonas se han descrito en detalle en otro lugar (véase solicitud de patente internacional WO99/05163). Los minipolipéptidos de chaperonas poseen actividad de chaperona cuando están en forma monomérica y no necesitan energía en forma de ATP. Los fragmentos definidos del dominio apical de GroEL de aproximadamente
- 35 143-186 residuos de aminoácidos de longitud tienen actividad de chaperona molecular hacia proteínas en solución en condiciones monoméricas o cuando están monodispersas y unidas a un soporte.
- Los armazones GroEL y/o GroES permiten la oligomerización de polipéptidos para formar oligómeros de proteínas funcionales que tienen actividades que superan las de los polipéptidos monoméricos recombinantes. Cpn10 es un componente extendido del sistema de chaperonina cpn60/cpn10. Los ejemplos de cpn10 incluyen GroES bacteriano
- 40 y Gp31 T4 bacteriófago, y son también se enumeran más adelante. Los expertos en la técnica conocerán más miembros de la familia cpn10.
- Las subunidades de armazón de proteínas se reúnen para formar un armazón de proteínas. Dicho armazón puede tener cualquier forma y puede comprender cualquier número de subunidades. Para algunas realizaciones de GroEL y GroES, el armazón comprende entre 2 y 20 subunidades, entre 5 y 15 subunidades, o aproximadamente 10
- 45 subunidades. La estructura de armazón de ocurrencia natural de los miembros de la familia cpn10 comprende siete subunidades, en forma de un anillo de siete eslabones. En algunas realizaciones, por tanto, el armazón es un anillo de siete eslabones.
- Puede insertarse una secuencia de aminoácidos heteróloga, que puede ser, p. ej., un dominio CDR3 procedente de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que posee afinidad por una proteína diana (p. ej., albúmina sérica humana) u, opcionalmente, que puede ser un residuo individual como cisteína que permite la unión de grupos o moléculas adicionales al armazón, en la secuencia de la subunidad de armazón de proteínas oligomerizable de manera que los extremos N y C del monómero de polipéptidos se forman por la secuencia de la subunidad del armazón de proteínas oligomerizable. Así, el polipéptido heterólogo se incluye con la secuencia de subunidad del armazón, por ejemplo sustituyendo uno o más aminoácidos del mismo.
- 50 Se conoce que las subunidades cpn10 poseen un "lazo móvil" en su estructura. El lazo móvil está situado entre los aminoácidos 15 y 34, preferiblemente entre los aminoácidos 16 a 33, de la secuencia de GroES de *E. coli*, y en posiciones equivalentes en otros miembros de la familia cpn10. El lazo móvil de Gp31 T4 está situado entre los residuos 22 a 45, preferiblemente 23 a 44. Opcionalmente, el polipéptido heterólogo puede insertarse sustituyendo parte o la totalidad del lazo móvil de un polipéptido de la familia cpn10. Cuando la subunidad del armazón de

proteínas es un polipéptido de la familia cpn10, la secuencia heteróloga puede incorporarse por otra parte en el extremo N o C de la misma, o en posiciones que son equivalentes a la horquilla b de techo de los péptidos de la familia cpn10. Esta posición está situada entre las posiciones 54 y 67, preferiblemente 55 a 66, y preferiblemente 59 y 61 de Gp31 T4 de bacteriófago, o entre las posiciones 43 a 63, preferiblemente 44 a 62, ventajosamente 50 a 53 de GroES de *E. coli*.

Opcionalmente, un polipéptido puede insertarse en el extremo N o C de una subunidad de armazón en asociación con permutación circular de la subunidad en sí. La permutación circular se describe en Graf y Schachman, *PNAS (USA)*. 1996, 93: 11591. Esencialmente, el polipéptido se somete a permutación circular por fusión de los extremos N y C existentes, y la escisión de la cadena de polipéptidos en otras partes para crear nuevos extremos N y C. En una realización preferida de la invención, el polipéptido heterólogo puede incluirse en el extremo N y/o C formado después de la permutación circular. El sitio de formación de los nuevos extremos puede seleccionarse según las características deseadas, y puede incluir el lazo móvil y/o la horquilla β de techo.

Ventajosamente, pueden insertarse secuencias heterólogas, que pueden ser la misma o diferente, en más de una de las posiciones y/o en posiciones diferentes a las posiciones identificadas anteriormente dentro de la subunidad del armazón de proteínas. Así, cada subunidad puede comprender dos o más polipéptidos heterólogos, que se presentan en el armazón cuando este se ensambla. Los polipéptidos heterólogos pueden presentarse en una subunidad de armazón en forma libre o restringida, dependiendo del grado de libertad proporcionado por el sitio de inserción en la secuencia del armazón. Por ejemplo, si se modifica la longitud de las secuencias que flanquean los lazos móviles o de horquilla β en el armazón se modulará el grado de restricción de cualquier polipéptido heterólogo insertado en las mismas.

Las composiciones de GroEL y/o GroES también pueden comprender un oligómero de polipéptidos que comprende dos o más monómeros. El oligómero puede estar configurado como un heterooligómero, que comprende dos o más secuencias de aminoácidos diferentes insertadas en el armazón, o como un homooligómero, en el que las secuencias insertadas en el armazón son la misma.

Los monómeros que constituyen el oligómero pueden estar reticulados de forma covalente entre sí. La reticulación puede realizarse mediante enfoques recombinantes, de manera que los monómeros se expresen *ab initio* como un oligómero; alternatively, la reticulación puede realizarse en residuos Cys en el armazón. Por ejemplo, los residuos Cys singulares insertados entre las posiciones 50 y 53 del armazón de GroES, o posiciones equivalentes en otros miembros de la familia cpn10, pueden usarse para reticular las subunidades de armazón.

La naturaleza del polipéptido heterólogo insertado en la subunidad de armazón puede seleccionarse según se desee. En algunas realizaciones, se sintetizan proteínas de armazón que presentan anticuerpos o fragmentos de los mismos como dominios VH scFv, naturales o de camélidos y fragmentos de CDR VH.

En una realización de ejemplo, puede prepararse un monómero de polipéptidos de oligomerización como se describió anteriormente y/o como se indica en el documento WO-00/69907, incorporado en la presente memoria como referencia en su totalidad. El método de dicha preparación puede comprender la inserción de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido heterólogo en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una subunidad de un armazón de proteínas oligomerizable, que incorpora el ácido nucleico resultante en un vector de expresión, y que expresa el ácido nucleico para producir los monómeros de polipéptidos. Opcionalmente, puede producirse a continuación un oligómero de polipéptidos por medio de un proceso que comprende permitir que los monómeros de polipéptidos producidos como antes se asocien con un oligómero. En algunas realizaciones, los monómeros se reticulan para formar el oligómero.

En algunas realizaciones, un polipéptido de armazón se basa en los miembros de la familia cpn10/Hsp10, como GroES o un análogo de los mismos. Un análogo muy preferido es el polipéptido T4 Gp31. Los análogos de GroES, que incluyen Gp31, poseen un lazo móvil (Hunt, J. F., *et al.*, (1997) *Cell* 90, 361-371; Landry, S. J., *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11622-11627) que puede insertarse en, o sustituirse, con el fin de fusionar el polipéptido heterólogo en el armazón.

Los homólogos de cpn10 están extendidos en los animales, las plantas y las bacterias. Por ejemplo, una búsqueda en GenBank indica que se conocen homólogos cpn10 en las siguientes especies: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Aeromonas salmonicida*; *Agrobacterium tumefaciens*; *Allochromatium vinosum*; *Amoeba proteus symbiotic bacterium*; *Aqui/ex aeolicus*; *Arabidopsis thaliana*; *Bacillus sp*; *Bacillus stearothermophilus*; *Bacillus subtilis*; *Bartonella henselae*; *Bordetella pertussis*; *Borrelia burgdorferi*; *Brucella abortus*; *Buchnera aphidicola*; *Burkholderia cepacia*; *Burkholderia vietnamiensis*; *Campylobacter jejuni*; *Caulobacter crescentus*; *Chlamydia muridarum*; *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydophila pneumoniae*; *Clostridium acetobutylicum*; *Clostridium perfringens*; *Clostridium thermocellum*; coliphage T-Cowdria ruminantium; *Cyanelle Cyanophora paradoxa*; *Ehrlichia canis*; *Ehrlichia chaffeensis*; *Ehrlichia equi*; *Ehrlichia phagocytophila*; *Ehrlichia risticii*; *Ehrlichia sennetsu*; *Ehrlichia sp agente HGE*; *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacter agglomerans*; *Enterobacter amnigenus*; *Enterobacter asburiae*; *Enterobacter gergoviae*; *Enterobacter intermedius*; *Erwinia aphidicola*; *Erwinia carotovora*; *Erwinia herbicola*; *Escherichia coli*; *Francisella tularensis*; *Glicina max*; *Haemophilus ducreyi*; *Haemophilus influenzae Rd*; *Helicobacter pylori*; *Holospira obtusa*; *Homo sapiens*; *Klebsiella ornithinolytica*; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella*

planticola; *Klebsiella pneumoniae*; *Lactobacillus helveticus*; *Lactobacillus Zeae*; *Lactococcus lactis*; *Lawsonia intracellularis*; *Leptospira interrogans*; *Methylovorus sp cepa SS*; *Mycobacterium avium*; *Mycobacterium avium subsp avium*; *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*; *Mycobacterium leprae*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycoplasma genitalium*; *Mycoplasma pneumoniae*; *Myzus persicae primary endosymbiont*; *Neisseria gonorrhoeae*;
 5 *Oscillatoria sp NKBG*; *Pantoea ananas*; *Pasteurella multocida*; *Porphyromonas gingivalis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas putida*; *Rattus norvegicus*; *Rattus norvegicus*; *Rhizobium leguminosarum*; *Rhodobacter capsulatus*; *Rhodobacter sphaeroides*; *Rhodothermus marinus*; *Rickettsia prowazekii*; *Rickettsia rickettsii*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Serratia ficaria*; *Serratia marcescens*; *Serratia rubidaea*; *Sinorhizobium meliloti*; *Sitophilus oryzae principal endosymbiont*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Streptococcus pneumoniae*;
 10 *Streptomyces albus*; *Streptomyces coelicolor*; *Streptomyces coelicolor*; *Streptomyces lividans*; *Synechococcus sp*; *Synechococcus vulcanus*; *Synechocystis sp*; *Thermoanaerobacter brockii*; *Thermotoga maritima*; *Thermus aquaticus*; *Treponema pallidum*; *Wolbachia sp*; *Zymomonas mobilis*.

Una ventaja de las subunidades de la familia cpn10 es que poseen un lazo móvil, responsable de la actividad de plegamiento de la proteína de la chaperonina natural, que puede eliminarse sin afectar al armazón. La cpn10 con un
 15 lazo móvil suprimido no posee actividad biológica, lo que la convierte en un armazón ventajosamente inerte, minimizando así cualquier posible efecto perjudicial.

La inserción de un polipéptido apropiado biológicamente activo puede conferir una actividad biológica (p. ej., unión a albúmina sérica humana) en el nuevo polipéptido así generado. De hecho, la actividad biológica del polipéptido insertado puede mejorarse mediante la incorporación del polipéptido biológicamente activo en el armazón,
 20 especialmente, p. ej., cuando se usan métodos de cribado basados en afinidad y mutagénesis como se describe en la presente memoria se emplean para optimizar la unión a proteína diana de un polipéptido presentado en el armazón.

Son posibles sitios alternativos para la inserción de péptidos. Una opción ventajosa es en la posición equivalente a la horquilla β de techo en GroES. Esto implica la sustitución de Glu- en Gp31 por el péptido deseado. La secuencia de
 25 aminoácidos es Pro (59)-Glu(60)-Gly(61). Esta secuencia se convierte convenientemente en un sitio Smal en el nivel de ADN (CCC:GGG) que codifica Pro-Gly, dejando un sitio de inserción de extremo romo para inserción de péptidos como un fragmento de ADN. Análogamente, una inserción puede realizarse entre las posiciones 50 y 53 de la secuencia GroES, y en posiciones equivalentes en otros miembros de la familia cpn10. Alternativamente, puede usarse PCR inversa para presentar el péptido en el lado opuesto del armazón.

Los miembros de la familia cpn60/Hsp60 de moléculas de chaperonina pueden usarse también como armazones. Por ejemplo, puede usarse la chaperonina bacteriana tetradecamérica GroEL. En algunas realizaciones, se insertarían polipéptidos heterólogos entre las posiciones 191 y 376, en particular entre las posiciones 197 y 333 (representadas por sitios SacII diseñados y Cla I singulares) para mantener intacta la región bisagra entre los dominios ecuatorial y apical con el fin de impartir movilidad al polipéptido insertado. La elección del armazón puede
 30 depender de la aplicación pretendida del oligómero (o ligando específico doble que comprende y/o se deriva de dicho oligómero): por ejemplo, si el oligómero se destina a fines de vacunación, el uso de un armazón inmunógeno, como el derivado de *Mycobacterium tuberculosis*, es altamente ventajoso y confiere un efecto adyuvante.

También pueden usarse mutantes de moléculas cpn60. Por ejemplo, el mutante de anillo único de GroEL (GroELSR1) contiene cuatro mutaciones puntuales que realizan la unión principal entre los dos anillos de GroEL (R452E, E461A, S463A y V464A) y es funcionalmente inactivo *in vitro* porque se libera para unirse a GroES. GroELSR2 tiene una mutación adicional en Glu191-Gly, que restaura la actividad reduciendo la afinidad por GroES. Estos dos mutantes forman estructuras en anillo y serían adecuados para su uso como armazones.
 40

Algunas moléculas de armazón de ocurrencia natural son productos bacteriófagos: por este motivo, los anticuerpos de ocurrencia natural como estos armazones son raros. Este hecho fomenta el uso de fusiones de armazón como
 45 agentes de vacuna. Gp31 T4 con un lazo suprimido no tiene actividad biológica (salvo como vacuna intracelular o negativa dominante frente a bacteriófago T4) minimizando así los efectos perjudiciales en el hospedador. Sin embargo, la inserción de secuencias apropiadas que codifican polipéptidos pueden conferir actividad biológica en las nuevas proteínas. De hecho, la actividad biológica puede mejorarse mediante la inserción en la proteína de armazón.

La afinidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos por antígenos (p. ej., albúminas séricas humanas) puede incrementarse por oligomerización según la presente invención. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser fragmentos como fragmentos Fv, Fab y F(ab')₂ o cualquier derivado de los mismos, como fragmentos Fv monocatenarios. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser no recombinantes, recombinantes o humanizados. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina, p. ej., IgG, IgM, y así sucesivamente.
 50

En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos pueden ser dominios VH camelizados. Se conoce que las principales interacciones intermoleculares entre anticuerpos y sus antígenos semejantes están mediadas a través de CDR3 VH.
 55

El uso de moléculas de armazón de GroEL y/o GroES (cpn10) como se describe más adelante y como se conoce en

la técnica proporciona para la oligomerización de dominios VH, o dominios CDR3 de VH, para producir un oligómero de alta afinidad. Pueden incluirse dos o más dominios en dicho oligómero; en un oligómero basado en un armazón cpn10, pueden incluirse hasta 7 dominios, para formar una molécula oligomérica heptamérica (heptacuerpo) que está unida a una proteína diana (p. ej., albúmina sérica humana).

- 5 Con el fin de impartir y/u optimizar la afinidad de ciertos polipéptidos/oligómeros de armazón para una proteína diana (p. ej., albúmina sérica humana), puede introducirse una variación en polipéptidos heterólogos insertados en los polipéptidos de armazón, de manera que puede examinarse y/o cartografiarse la especificidad y/o afinidad de dichos polipéptidos/oligómeros por sus ligandos/sustratos. Pueden producirse variantes del mismo lazo, o puede idearse un conjunto de diferentes lazos estándar, con el fin de evaluar rápidamente la afinidad de un nuevo polipéptido por una
- 10 proteína diana (p. ej., albúmina sérica humana). Pueden producirse variantes por aleatorización de secuencias según técnicas conocidas, como PCR. Pueden someterse a selección mediante un protocolo de cribado, como presentación de fagos, antes de su incorporación en armazones de proteínas.

- Un "armazón oligomerizable", como se refiere en la presente memoria, es un polipéptido que es capaz de oligomerizar o ser oligomerizado para formar un armazón y con el que puede fusionarse un polipéptido heterólogo,
- 15 preferiblemente de forma covalente, sin suprimir las capacidades de oligomerización. Así, proporciona un "armazón" mediante cuyo uso los polipéptidos pueden disponerse en múltiplos de acuerdo con la presente invención. Opcionalmente, pueden eliminarse partes del polipéptido natural del que se obtuvo el armazón, por ejemplo por sustitución por el polipéptido heterólogo que se presentará en el armazón.

- Los monómeros son polipéptidos que poseen la posibilidad de oligomerizar o ser oligomerizados. La oligomerización
- 20 puede realizarse mediante la incorporación, en el polipéptido, de una subunidad de armazón oligomerizable que se oligomerizará con subunidades de armazón adicionales si se combina con las mismas. Opcionalmente, la oligomerización puede realizarse por medio del uso de grupos enlazadores reconocidos en la técnica para la unión de monómeros.

- Como se emplea en la presente memoria, "oligómero" es sinónimo de "polímero" o "múltiplo" y se emplea para
- 25 indicar que el objeto en cuestión no es monomérico. Así, los polipéptidos oligoméricos comprenden al menos dos unidades monoméricas unidas entre sí por medios covalentes o no covalentes. El número de unidades monoméricas empleadas dependerá del uso pretendido del oligómero, y puede estar entre 2 y 20 o más. Opcionalmente, está entre 5 y 10, y preferiblemente es aproximadamente 7.

Presentación de fagos

- 30 La tecnología de presentación de fagos ha demostrado ser enormemente útil en las investigaciones biológicas. Permite seleccionar ligandos entre grandes bibliotecas de moléculas. La tecnología de armazón puede dominar la potencia de presentación de fagos de una manera excepcionalmente ventajosa. Las moléculas cpn10 pueden presentarse como monómeros en bacteriófagos fd, de forma similar a la presentación de moléculas de Fv monocatenarias. Las bibliotecas de inserciones (en lugar del lazo altamente móvil, p. ej., usando polipéptidos de
- 35 CDR3 obtenidos de anticuerpos de unión a albúmina sérica humana) se construyen mediante métodos estándar, y se criban las bibliotecas resultantes para las moléculas de interés. Esta selección se basa en la afinidad. Después de la identificación de moléculas que poseen afinidad por la proteína diana (p. ej., albúmina sérica humana), potencialmente por medio de una o más iteraciones de mutagénesis, expresión (las proteínas GroEL, GroEL de 57,5 kDa y GroES de 10 kDa, pueden expresarse y purificarse como se describe anteriormente (Chatellier *et al.* 1998
- 40 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 9861-9866; Corrales y Fersht 1996 1: 265-273), o por cualquier método reconocido en la técnica) y cribado de afinidad, dichas moléculas pueden someterse a oligomerización, aprovechándose así de la avidéz de dichas moléculas. Opcionalmente, algunos monómeros seleccionados podrán reticular u oligomerizar a sus partícipes de unión.

Fibronectina

- 45 Ejemplo 26: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas de fibronectina de unión a albúmina sérica por medio de injerto de CDR

- Los dominios CDR de dAb7h14 se emplean para construir un polipéptido de armazón de no inmunoglobulinas de fibronectina que se une a albúmina sérica humana de la siguiente manera. Las secuencias de CDR1 (RASQWIGSQLS; SEQ ID NO.: __), CDR2 (WRSSLQS; SEQ ID NO.: __) y CDR3 (AQGAALPRT ; SEQ ID NO.: __)
- 50 de dAb7h14 se injertan en ¹⁰Fn3 en sustitución de residuos de aminoácidos de ¹⁰Fn3 naturales en las posiciones 21-31 (el lazo BC), 51-56 (el lazo DE) y 76-88 (el lazo FG), respectivamente. El análisis de unión en tiempo real por Biacore se realiza para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a un polipéptido derivado de fibronectina inmovilizado que comprende los dominios de CDR de anti-albúmina sérica humana de dAb7h14. (Un experto en la técnica reconocerá que la afinidad de unión puede valorarse usando cualquier método apropiado, lo
- 55 que incluye, p. ej., precipitación de albúmina sérica humana etiquetada, ensayo de Biacore competitivo, etc.). Si se detecta una afinidad por albúmina sérica humana baja o nula (p. ej., valores de Kd en el intervalo de μM o superior), se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para mejorar las propiedades de unión a albúmina sérica humana del polipéptido de fibronectina injertado en CDR, lo que incluye cualquiera de los métodos siguientes que

contribuyen a la afinidad de unión.

La longitud o longitudes de regiones injertadas con CDR dAb7h14 del polipéptido de fibronectina correspondiente a regiones de lazo expuestas a disolvente en el polipéptido de fibronectina natural se ajustan a través del uso de polipéptidos de grupo enlazador. Por ejemplo, la secuencia peptídica de CDR3 de nueve residuos de aminoácidos CDR3 de dAb7h14 se extiende a 13 residuos de aminoácidos de longitud usando grupos enlazadores de aminoácidos de, p. ej., cero a cuatro residuos de longitud situados en uno y/o los dos flancos de los extremos N o C de la secuencia polipeptídica de CDR3 dAb7h14, consiguiendo así una longitud de secuencia peptídica injertada total de 13 aminoácidos en el dominio injertado con CDR3 correspondiente al lazo FG en la secuencia de fibronectina natural. Dicho uso de polipéptido o polipéptidos de grupo enlazador se combina opcionalmente con la mutagénesis de las secuencias de grupo enlazador, secuencias de CDR y/o secuencias de fibronectina no de CDR (por ejemplo, usando procedimientos de optimización mutagénicos como se describe más adelante), con el fin de mejorar la capacidad de unión a albúmina sérica humana de polipéptidos de fibronectinas injertados con CDR (p. ej., mediante optimización de secuencias de CDR y fibronectina en los polipéptidos de fibronectina injertados con CDR). Los grupos enlazadores polipeptídicos empleados para este fin poseen una secuencia predeterminada, u, opcionalmente, se seleccionan entre una población de secuencias polipeptídicas de grupos enlazadores aleatorizados mediante la evaluación de las capacidades de unión a albúmina sérica humana de polipéptidos de fibronectina injertados con CDR que contienen grupo enlazador. Los métodos de optimización se realizan en paralelo y/o iterativamente. Tanto los procesos de optimización en paralelo como iterativos (p. ej., maduración de afinidad) emplean métodos de selección como se describe más adelante y/o como se conoce en la técnica como útiles para la optimización de las propiedades de unión de los polipéptidos.

La unión a albúmina sérica humana del polipéptido o polipéptidos de fibronectina injertados con CDR que presentan CDR de dAb7h14 se optimiza mediante mutagénesis, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptidos de armazón ¹⁰F_n3 que rodean a las secuencias polipeptídicas de CDR dAb7h14 injertadas se someten a mutagénesis aleatorizada y/o NNK, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza en la secuencia polipeptídica ¹⁰F_n3 en los aminoácidos 1-9, 44-50, 61-54, 82-94 (bordes de hojas beta); 19, 21, 30-46 (pares), 79-65 (impares) (caras accesibles a los disolventes de las dos hojas beta); y 14-16 y 36-45 (lazos accesibles a disolventes no del tipo CDR y giros beta), y opcionalmente se aleatoriza con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados de unión a albúmina sérica humana. Opcionalmente, los dominios de polipéptidos de CDR dAb7h14 presentados en el polipéptido de fibronectina injertado con CDR se someten a mutagénesis mediante, p. ej., mutagénesis aleatoria, mutagénesis NNK, mutagénesis de revisión y/u otro método reconocido por la técnica. Para realizar dichos métodos de mutagénesis se usa opcionalmente PCR, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias a través de secuencias direccionadas en los polipéptidos de fibronectina injertados con CDR. Estas estrategias son similares a las descritas más adelante para generación de bibliotecas de dAb. Además de métodos de mutagénesis aleatoria y/o de revisión, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en donde la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos que son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.

Los polipéptidos de fibronectina que comprenden secuencias de CDR dAb7h14 injertadas diseñadas como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos de fibronectina que están optimizados para la unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas de fibronectina injertadas con CDR dAb7h14, esta biblioteca de dichos polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren unión a albúmina sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), con polipéptidos derivados de fibronectina totalmente optimizados que idealmente alcanzan valores de K_d de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor. Después de la identificación de los polipéptidos derivados de fibronectina que se unen a albúmina sérica humana, dichos polipéptidos se usan para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Ejemplo 27: Generación de ligando específico doble que comprende un armazón de no inmunoglobulinas de fibronectina de unión a albúmina sérica por medio de selección de restos de unión a albúmina sérica

La proteína de fibronectina natural, específicamente el polipéptido de fibronectina ¹⁰F_n3, se somete a técnicas de selección de bibliotecas y, opcionalmente, maduración de afinidad con el fin de producir moléculas de armazón de no inmunoglobulinas de fibronectina de unión a albúmina sérica para su uso en los ligandos específicos dobles descritos en la presente memoria.

Se realiza un análisis de unión en tiempo real por Biacore para valorar si la albúmina sérica humana está unida específicamente a polipéptido de fibronectina y/o derivado de fibronectina natural inmovilizado. Después de la detección de afinidad de unión nula o baja (p. ej., valores de K_d en el intervalo de μM o superior) de un polipéptido de fibronectina para albúmina sérica humana, se emplea al menos una de un conjunto de estrategias para impartir

propiedades de unión a albúmina sérica humana al polipéptido de fibronectina, lo que incluye uno o más de los métodos siguientes que contribuyen a la afinidad de unión.

La unión a albúmina sérica humana de polipéptido o polipéptidos de unión a fibronectina se consigue y se optimiza mediante métodos mutagénicos, opcionalmente en combinación con métodos de selección en paralelo y/o iterativos como se describe más adelante y/o se conoce por otros medios en la técnica. Los dominios de polipéptidos de armazón ¹⁰F_n3 se someten a mutagénesis aleatorizada y/o N_{NNK}, realizada como se describe más adelante. Dicha mutagénesis se realiza sobre la totalidad del polipéptido ¹⁰F_n3 o sobre secuencias específicas en el polipéptido ¹⁰F_n3, lo que incluye aminoácidos 1-9, 44-50, 61-54, 82-94 (bordes de hojas beta); 19, 21, 30-46 (pares), 79-65 (impares) (caras accesibles a disolvente de las dos hojas beta); 21-31, 51-56, 76-88 (lazos accesibles a disolvente de tipo CDR); y 14-16 y 36-45 (otros lazos accesibles a disolventes y giros beta), y opcionalmente se aleatoriza con el fin de obtener por evolución polipéptidos nuevos o mejorados de unión a albúmina sérica humana. La PCR se usa opcionalmente para realizar dichos métodos de mutagénesis, lo que produce la generación de una diversidad de secuencias a través de secuencias direccionadas en los polipéptidos de fibronectina. (estas estrategias son similares a las descritas más adelante para generación de bibliotecas de dAb). Además de métodos aleatorios de mutagénesis, se emplea mutagénesis dirigida de residuos de aminoácidos direccionados en donde la información estructural establece residuos de aminoácidos específicos de polipéptidos de fibronectina que son fundamentales para la unión de albúmina sérica humana.

Los polipéptidos de fibronectina diseñados como se describió anteriormente se someten a métodos de selección en paralelo y/o iterativos para identificar aquellos polipéptidos de fibronectina que están optimizados para la unión a albúmina sérica humana. Por ejemplo, después de la producción de una biblioteca de secuencias polipeptídicas de fibronectina mutagenizadas, dicha biblioteca de polipéptidos se presenta en fagos y se somete a múltiples tandas de selección que requieren unión a albúmina sérica y/o proliferación, como se describe más adelante para selección de dAb de unión a albúmina sérica a partir de bibliotecas de dAb. Opcionalmente, la selección se realiza frente a albúmina sérica inmovilizada en inmunotubos o frente a albúmina sérica biotinilada en solución. Opcionalmente, la afinidad de unión se determina usando resonancia por plasmones superficiales (SPR) y Biacore (Karlsson *et al.*, 1991), usando un sistema Biacore (Uppsala, Suecia), con polipéptidos derivados de fibronectina totalmente optimizados que alcanzan idealmente valores de K_d de afinidad de unión a albúmina sérica en el intervalo de nM o mejor.

Después de la identificación de polipéptidos de fibronectina que se unen a albúmina sérica humana, dichos polipéptidos se usan para generar composiciones de ligandos específicos dobles por cualquiera de los métodos descritos más adelante.

Armazones de no inmunoglobulinas de fibronectina

Un armazón de no inmunoglobulinas que comprende fibronectina, o un resto funcional y/o fragmento del mismo, puede diseñarse para unirse a albúmina sérica. Se usa una estructura de armazón de no inmunoglobulinas obtenida del módulo de fibronectina tipo III (Fn3). El módulo de fibronectina tipo III es un dominio común existente en las proteínas estructurales y de sangre de mamífero, que aparece más de 400 veces en la base de datos de secuencias de proteínas y que, según se estima, aparece en el 2 % de todas las proteínas secuenciadas hasta la fecha. Las proteínas que incluyen una secuencia de módulo Fn3 incluyen fibronectinas, tenascina, proteínas citoesqueléticas intracelulares y enzimas procarióticas (Bork y Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8990, 1992; Bork *et al.*, *Nature Biotech.* 15:553, 1997; Meinke *et al.*, *J. Bacteriol.* 175:1910, 1993; Watanabe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:15659, 1990). Un armazón de no inmunoglobulinas de fibronectina en particular es el décimo módulo de Fn3 humana (¹⁰F_n3), que comprende 94 residuos de aminoácidos. El plegamiento total de este dominio está relacionado estrechamente con el del menor fragmento de anticuerpo funcional, la región variable de la cadena pesada, que comprende la unidad de reconocimiento de antígeno completa en IgG de camello y llama. Las principales diferencias entre los dominios de camello y llama y el dominio ¹⁰F_n3 consisten en que (i) ¹⁰F_n3 tiene menos cadenas beta (siete frente a nueve) y (ii) las dos hojas beta empaquetadas entre sí están conectadas por un puente de disulfuro en los dominios de camello y llama, pero no en ¹⁰F_n3.

Los tres lazos de ¹⁰F_n3 que corresponden a los lazos de unión a antígeno de la cadena pesada de IgG se sitúan entre los residuos de aminoácidos 21-31 (BC), 51-56 (DE) y 76-88 (FG) (consúltese la Figura 3 de la patente de EE.UU. n° 7.115.396, cuyo contenido completo se incorpora en la presente memoria como referencia). Las longitudes de los lazos BC y DE, 11 y 6 residuos, respectivamente, se sitúan dentro del estrecho intervalo de los lazos de reconocimiento de antígeno correspondientes que están presentes en las cadenas pesadas de anticuerpos, es decir, 7-10 y 4-8 residuos, respectivamente. Por consiguiente, puede emplearse fácilmente una estrategia de injerto con CDR para introducir secuencias de CDR de cadena pesada en estos dominios. De forma adicional y/o alternativa, estos dos lazos pueden someterse a la introducción de variabilidad genética por cualquier método reconocido en la técnica (p. ej., método de mutagénesis dirigida al sitio, de revisión u otro, aleatorización, etc.). y, opcionalmente, el polipéptido resultante puede someterse a selección para alta afinidad de antígeno. (Alternativamente, puede usarse la introducción de procedimientos de variabilidad genética y/o selección para identificar composiciones con menor afinidad de unión y/o propiedades optimizadas como estabilidad, toxicidad, etc.). A través del uso de estos métodos, los lazos BC y DE de fibronectina pueden diseñarse de manera que formen contactos con antígenos equivalentes a los contactos de los dominios CDR1 y CDR2 correspondientes en los

anticuerpos.

A diferencia de los lazos BC y DE, el lazo FG de ¹⁰F_n3 tiene 12 residuos de longitud, mientras que el lazo correspondiente en las cadenas pesadas de anticuerpos está comprendido entre 4-28 residuos. Por consiguiente, para optimizar la unión a antígeno, puede variarse la longitud del lazo FG de ¹⁰F_n3 (p. ej., mediante el uso de aleatorización y/o el uso de secuencias polipeptídicas de grupo enlazador (que también pueden aleatorizarse)) así como en la secuencia para cubrir el intervalo de longitud de CDR3 de 4-28 residuos para obtener la mayor flexibilidad y afinidad posibles en unión a antígenos. De hecho, para aquellos métodos en los que las CDR se injertan directamente en un armazón de fibronectina y en las que se selecciona un armazón de fibronectina natural y/o se optimiza para unión de albúmina sérica (u otro antígeno diana), las longitudes así como las secuencias de los lazos de tipo CDR de la emulación del anticuerpo pueden aleatorizarse durante la maduración de afinidad *in vitro* o *in vivo* (como se describe en más detalle más adelante).

El décimo dominio de tipo III de fibronectina humana, ¹⁰F_n3, se vuelve a plegar rápidamente incluso a baja temperatura; su conformación principal se ha recuperado en 1 segundo a 5 °C. La estabilidad termodinámica de ¹⁰F_n3 es alta ($\Delta G_u=24$ kJ/mol=5,7 kcal/mol), un hecho correlacionado con su alta temperatura de fusión de 110 °C.

Una de las funciones fisiológicas de ¹⁰F_n3 es como una subunidad de fibronectina, una glucoproteína que existe en una forma soluble en los líquidos corporales y en una forma insoluble en la matriz extracelular (Dickinson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 236:1079, 1994). Un monómero de fibronectina de 220-250 Kd contiene 12 módulos de tipo I, dos módulos de tipo II y 17 módulos de fibronectina de tipo III (Potts y Campbell, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:648, 1994). En la unión de la fibronectina a las integrinas, la heparina y el sulfato de condroitina intervienen diferentes módulos de tipo III. Se determinó que ¹⁰F_n3 actúa como mediador en la adhesión celular a través de un motivo Arg-Gly-Asp (RGD) de unión a integrina en uno de sus lazos expuestos. Se ha demostrado que otros motivos RGD similares intervienen en la unión a integrina por otras proteínas, como fibrinógeno, factor de von Willebrand y vitronectina (Hynes *et al.*, *Cell* 69:11, 1992). No se ha descrito ninguna otra función de unión a matriz o a células para ¹⁰F_n3.

La observación de que ¹⁰F_n3 tiene una actividad solo ligeramente más adhesiva que un péptido corto que contiene RGD es coherente con la conclusión de que la actividad de unión a células de ¹⁰F_n3 está localizada en el péptido RGD más que distribuida por toda la estructura de ¹⁰F_n3 (Baron *et al.*, *Biochemistry* 31:2068, 1992). El hecho de que sea improbable que ¹⁰F_n3 sin el motivo RGD se una a otras proteínas plasmáticas o a la matriz extracelular convierte a ¹⁰F_n3 en un armazón útil para reponer los anticuerpos. Además, la presencia de ¹⁰F_n3 en el fibrinógeno natural en el torrente sanguíneo indica que es probable que ¹⁰F_n3 sea inmunógeno en el organismo ya de origen.

Además, se ha demostrado que el marco ¹⁰F_n3 posee secuencias de lazo expuestas tolerantes de aleatorización, lo que facilita la generación de diversas reservas de emulaciones de anticuerpos. Esta determinación se realizó examinando la flexibilidad de la secuencia ¹⁰F_n3. En particular, la secuencia ¹⁰F_n3 humana se alineó con las secuencias de fibronectinas de otras fuentes así como secuencias de proteínas relacionadas, y se estableció una correspondencia entre los resultados de esta alineación y la estructura tridimensional del dominio ¹⁰F_n3 humano. Esta alineación reveló que la mayoría de los residuos conservados estaban presentes en el núcleo de la intercalación de las hojas beta, mientras que los residuos altamente variables estaban localizados en los bordes de las hojas beta, que incluyen los extremos N y C, en las caras accesibles a disolvente de las dos hojas beta, y en tres lazos accesibles a disolvente que actuaban como los lazos hipervariables para la maduración de afinidad de los emuladores de anticuerpos. A la vista de estos resultados, se determinó que era improbable que la aleatorización de estos tres lazos tuviera un efecto adverso en el plegamiento o la estabilidad general del marco ¹⁰F_n3 en sí.

Para la secuencia ¹⁰F_n3 humana, este análisis indicaba que, como mínimo, los aminoácidos 1-9, 44-50, 61-54, 82-94 (bordes de hojas beta); 19, 21, 30-46 (pares), 79-65 (impares) (caras accesibles a disolvente de las dos hojas beta); 21-31, 51-56, 76-88 (lazos accesibles a disolvente de tipo CDR); y 14-16 y 36-45 (otros lazos accesibles a disolventes y giros beta) podrían aleatorizarse para obtener por evolución proteínas de unión a compuestos nuevas o mejoradas. Además, como se expone anteriormente, las alteraciones en las longitudes de uno o más lazos expuestos a disolventes también podrían incluirse en dichos métodos de evolución dirigidos.

Alternativamente, los cambios en las secuencias de hojas β también podrían usarse para obtener por evolución nuevas proteínas. Estas mutaciones modifican el armazón y así alteran indirectamente la o las estructuras de lazo. Si se adopta este enfoque, las mutaciones no deberían saturar la secuencia, sino que se introducirían bastantes pocas mutaciones. Preferiblemente, mediante este planteamiento deberían introducirse no más de entre 3-20 cambios en las secuencias de las hojas β .

Puede introducirse una variación de secuencias por cualquier técnica que incluye, por ejemplo, mutagénesis por polimerasa Taq (Tindall y Kunkel, *Biochemistry* 27:6008 (1988)), recombinación de fragmentos o una combinación de los mismos. Análogamente, puede usarse un aumento en la diversidad estructural de las bibliotecas, por ejemplo, modificando la longitud así como la secuencia de los lazos de presentación de CDR y/o de tipo CDR, o por rediseño estructural basado en las mutaciones de marco ventajosas presentes en reservas seleccionadas, con el fin de introducir mejoras adicionales en los armazones de no inmunoglobulinas.

Proteínas de fusión que comprenden polipéptidos de armazón de fibronectina

Los polipéptidos de armazón de fibronectina descritos en la presente memoria pueden fusionarse con otros dominios de proteínas. Por ejemplo, los polipéptidos de armazón de fibronectina identificados para la unión a albúmina sérica humana pueden fusionarse con dominios individuales de cadenas pesadas variables, o un fragmento de unión a antígenos de los mismos, con el fin de generar un ligando específico doble que comprende un resto de unión a albúmina sérica basado en fibronectina. Los polipéptidos de armazón de fibronectina pueden integrarse adicionalmente con la respuesta inmunitaria humana fusionando la región constante de una IgG (Fc) con un polipéptido de armazón de fibronectina, como un módulo ¹⁰Fn3, preferiblemente a través del extremo C de ¹⁰Fn3. El Fc de dicha molécula de fusión ¹⁰Fn3-Fc activa el componente de complemento de la respuesta autoinmunitaria y puede servir para aumentar el valor terapéutico del polipéptido de fibronectina diseñado. Análogamente, puede usarse una fusión entre un polipéptido de armazón de fibronectina, como ¹⁰Fn3, y una proteína de complemento, como C1q, para células diana, y puede usarse una fusión entre un polipéptido de armazón de fibronectina, como ¹⁰Fn3, y una toxina para destruir específicamente las células que transportan un antígeno particular. Cualquiera de estas fusiones puede generarse mediante técnicas estándar, por ejemplo, por expresión de la proteína de fusión a partir de un gen de fusión recombinante construido usando secuencias génicas disponibles públicamente y/o como se describe más adelante por otros medios.

Multímeros de armazón

Además de monómeros, puede generarse cualquiera de las construcciones de armazón de fibronectina descritas en la presente memoria como dímeros o multímeros de armazones como un medio para aumentar la valencia y así la avidéz de la unión a antígeno (p. ej., albúmina sérica). Dichos multímeros pueden generarse a través de unión covalente. Por ejemplo, los módulos ¹⁰Fn3 individuales pueden unirse imitando la unión natural en el extremo C a N ⁸Fn3-⁹Fn3-¹⁰Fn3 o imitando los dímeros de anticuerpos que se mantienen juntos a través de sus regiones constantes. Puede aprovecharse una construcción ¹⁰Fn3-Fc para diseñar dímeros del esquema general de ¹⁰Fn3-Fc::Fc-¹⁰Fn3. Los enlaces diseñados en la interfaz Fc::Fc pueden ser covalentes o no covalentes. Además, pueden usarse partícipes de dimerización o multimerización distintos de Fc, como otros restos de armazón de no inmunoglobulinas y/o restos de unión a antígenos basados en inmunoglobulinas, en híbridos, como híbridos ¹⁰Fn3, para crear dichas estructuras de orden superior. Otros ejemplos de multímeros incluyen los dominios variables individuales descritos en la presente memoria.

En ejemplos particulares, pueden generarse multímeros unidos covalentemente construyendo genes de fusión que codifican el multímero o, alternativamente, diseñando codones para residuos de cisteína en secuencias monoméricas y permitiendo que tenga lugar la formación de enlaces de disulfuro entre los productos de expresión. También pueden generarse multímeros unidos de forma no covalente mediante diversas técnicas. En ellos se incluye la introducción, en secuencias monoméricas, de codones que corresponden a residuos con carga positiva y/o negativa y que permiten que se produzcan interacciones entre estos residuos en los productos de expresión (y por tanto entre los monómeros). Este planteamiento puede simplificarse aprovechando los residuos cargados presentes naturalmente en una subunidad de monómero, por ejemplo, los residuos de carga negativa de fibronectina. Otro medio de generar composiciones con enlaces no covalentes que comprenden polipéptidos de armazón de fibronectina consiste en introducir, en el gen del monómero (por ejemplo, en los extremos amino o carboxi), las secuencias codificantes para proteínas o dominios de proteínas con los que se sabe que interactúan. Dichas proteínas o dominios de proteínas incluyen motivos de espiral-espiral, motivos de cremallera de leucina y cualquiera de las numerosas subunidades de proteínas (o fragmentos de las mismas) para las que se conoce que dirigen la formación de dímeros o multímeros de orden superior.

Moléculas de tipo fibronectina

Aunque ¹⁰Fn3 representa un armazón preferido para la generación de emuladores de anticuerpos, pueden sustituirse otras moléculas por ¹⁰Fn3 en las moléculas descritas en la presente memoria. Entre ellas se incluyen, sin limitación, módulos de fibronectina humana ¹Fn3-⁹Fn3 y ¹¹Fn3-¹⁷Fn3 así como módulos Fn3 relacionados a partir de animales no humanos y procariontes. Además, pueden usarse también los módulos Fn3 de otras proteínas con homología de secuencias con ¹⁰Fn3, como las tenascinas y las undulinas. Otros armazones de ejemplo que tienen plegamientos de tipo inmunoglobulina (pero con secuencias que no están relacionadas con el dominio V_H) incluyen N-cadherina, ICAM-2, titina, receptor de GCSF, receptor de citocina, inhibidor de glucosidasa, E-cadherina y cromoproteína antibiótica. Pueden obtenerse dominios adicionales con estructuras relacionadas de molécula de adhesión a membrana de mielina P0, CD8, CD4, CD2, MHC clase I, receptor de antígenos de linfocitos T, CD1, C2 y dominios I-set de VCAM-1, dominio de inmunoglobulinas I-set de miosina-proteína de unión C, dominio de inmunoglobulinas I-set de miosina-proteína de unión H, dominio de inmunoglobulinas I-set de telocina, telicina, NCAM, twitchina, neurogliano, receptor de hormona del crecimiento, receptor de eritropoyetina, receptor de prolactina, receptor de GC-SF, receptor de interferón-gamma, β-galactosidasa/glucuronidasa, β-glucuronidasa y transglutaminasa. Alternativamente, puede usarse cualquier otra proteína que incluye uno o más plegamientos de tipo inmunoglobulina. Dichas proteínas pueden identificarse, por ejemplo, usando el programa SCOP (Murzin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 247:536 (1995); Lo Conte *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 25:257 (2000).

En general, cualquier molécula que muestre una relación estructural con el dominio V_H (como se identifica, por

ejemplo, usando el programa informático SCOP anterior) puede usarse como un almacén de no inmunoglobulinas. Estas moléculas, como la fibronectina, pueden incluir tres lazos en el polo del extremo N de la molécula y tres lazos en el polo del extremo C, cada uno de los cuales puede aleatorizarse para crear diversas bibliotecas; alternativamente, pueden usarse dominios más grandes, que tienen un mayor número de lazos, siempre y cuando
 5 haya un número de dichos lazos aleatorizables en superficie situado suficientemente cerca en el espacio como para que pueda participar en la unión al antígeno. Los ejemplos de polipéptidos que poseen más de tres lazos dispuestos cerca unos de otros incluyen receptor de antígenos de linfocitos T y superóxido dismutasa, que tienen cada uno cuatro lazos que pueden aleatorizarse; y un dímero Fn3, dominios de factor tisular y dominios de receptor de citocina, cada uno de los cuales tiene tres conjuntos de dos dominios similares en los que tres lazos aleatorizables
 10 forman parte de los dos dominios (para llevar el número total de lazos a seis).

En otra alternativa más, puede usarse cualquier proteína que tenga lazos variables colocados suficientemente cerca en el espacio para la producción de proteínas de unión candidatas. Por ejemplo, pueden usarse proteínas grandes que tienen lazos accesibles a disolventes relacionados espacialmente, incluso si no están relacionadas estructuralmente con un plegamiento de tipo inmunoglobulina. Las proteínas de ejemplo incluyen, sin limitación,
 15 citocromo F, proteína fluorescente verde, GroEL y taumatina. Los lazos presentados por estas proteínas pueden estar aleatorizados y se seleccionan ligantes superiores a partir de una biblioteca aleatorizada como se describe en la presente memoria, p. ej. en el Ejemplo 1. Debido a su tamaño, pueden obtenerse moléculas que muestran una superficie de unión a antígeno considerablemente mayor que la encontrada en una interacción anticuerpo-antígeno. Otros almacenes útiles de este tipo pueden identificarse también usando el programa SCOP (Murzin *et al.*, *J. Mol.*
 20 *Biol.* 247: 536 (1995)) para buscar entre proteínas candidatas que tienen numerosos lazos, sobre todo lazos colocados entre hojas beta paralelas o una serie de hélices alfa.

Los módulos de diferentes organismos y proteínas progenitoras pueden ser los más apropiados para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, en el diseño de un polipéptido de almacén de fibronectina, pueden ser los más convenientes para generar esa proteína a partir de una molécula de fibronectina o de tipo fibronectina natural para el
 25 organismo para el cual se pretende la acción terapéutica. En cambio, el organismo de origen es menos importante o incluso es irrelevante para los almacenes de fibronectina que se usarán para aplicaciones *in vitro*, como diagnóstico, o como reactivos de investigación.

Para cualquiera de estas moléculas, pueden generarse bibliotecas y usarse para seleccionar proteínas de unión por cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

30 Evolución dirigida de proteínas de unión basadas en almacén

Los almacenes de no inmunoglobulinas descritos en la presente memoria pueden usarse en cualquier técnica para hacer evolucionar proteínas de unión nuevas o mejoradas. En un ejemplo en particular, la diana de unión (por ejemplo, albúmina sérica) se inmoviliza sobre un soporte sólido, como una resina de columna o un pocillo de placa de microvaloración, y la diana se pone en contacto con una biblioteca de proteínas de unión basadas en almacén de
 35 no inmunoglobulinas candidatas. Dicha biblioteca puede consistir en clones de almacén de fibronectina, como clones ¹⁰F_n3 construidos a partir de almacén ¹⁰F_n3 natural (tipo silvestre) a través de la aleatorización de la secuencia y/o la longitud de los lazos de tipo CDR ¹⁰F_n3. Si se desea, esta biblioteca puede ser una biblioteca de fusión de proteínas de ARN generada, por ejemplo, por las técnicas descritas en Szostak *et al.*, documento de EE.UU. n° serie 09/007.005 y documento n° serie 09/247.190; Szostak *et al.*, WO98/31700; y Roberts & Szostak,
 40 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) vol. 94, p. 12297-12302. Alternativamente, puede ser una biblioteca de proteínas de ADN (por ejemplo, como se describe en Lohse, DNA-Protein Fusions and Uses Thereof, documento de EE.UU. n° serie 60/110.549, documento de EE.UU. n° serie 09/459.190, y WO-00/32823). Se incubó la biblioteca de fusión con la diana inmovilizada, se lava el soporte para eliminar ligantes no específicos y se eluyen los ligantes más firmes en condiciones muy severas y se someten a PCR para recuperar la información de secuencia o para crear una
 45 nueva biblioteca de ligantes que puede usarse para repetir el proceso de selección, con o sin mutagénesis adicional de la secuencia. Puede realizarse una serie de tandas de selección hasta que se obtengan ligantes de suficiente afinidad para el antígeno (por ejemplo, albúmina sérica).

En un ejemplo en particular, el almacén ¹⁰F_n3 puede usarse como la diana de selección. Por ejemplo, si se requiere una proteína que se una a una secuencia peptídica específica (p. ej., albúmina sérica) presentada en un lazo de diez
 50 residuos, se construye un único clon de ¹⁰F_n3 en el que para uno de sus lazos se ha fijado una longitud de diez y para la secuencia deseada. El nuevo clon se expresa in vivo y se purifica, y después se inmoviliza en un soporte sólido. A continuación se deja que una biblioteca de fusión de proteínas de ARN basada en un almacén apropiado interactúe con el soporte, que a continuación se lava, y las moléculas deseadas se eluyen y se vuelven a seleccionar como se describió anteriormente.

55 Análogamente, los almacenes descritos en la presente memoria, por ejemplo, el almacén ¹⁰F_n3, pueden usarse para encontrar proteínas naturales que interactúan con la secuencia peptídica mostrada por el almacén, por ejemplo, en un lazo ¹⁰F_n3. La proteína de almacén, como la proteína ¹⁰F_n3, está inmovilizada como se describió anteriormente, y se criba una biblioteca de fusión de proteínas de ARN para ligantes en el lazo presentado. Los ligantes se enriquecen a través de múltiples tandas de selección y se identifican mediante secuenciación de ADN.

Además, en los planteamientos anteriores, aunque las bibliotecas de proteínas de ARN representan bibliotecas de ejemplo para evolución dirigida, en los métodos de selección descritos en la presente memoria puede usarse cualquier tipo de biblioteca basada en armazón.

Uso de polipéptidos de armazón de fibronectina

5 Los polipéptidos de armazón de fibronectina descritos en la presente memoria pueden hacerse evolucionar para unirse a albúmina sérica o a cualquier antígeno de interés. Dichas proteínas de armazón de fibronectina tienen propiedades termodinámicas superiores a las de los anticuerpos naturales y pueden hacerse evolucionar rápidamente *in vitro*. Por consiguiente, estos polipéptidos de armazón de fibronectina pueden emplearse para producir dominios de unión para su uso en los campos de la investigación, la terapia y el diagnóstico.

10 Maduración de afinidad mutagénica

Las selecciones descritas en la presente memoria también pueden combinarse con mutagénesis después de la totalidad o de un subconjunto de las etapas de selección para aumentar aún más la diversidad de bibliotecas. Los métodos de maduración de afinidad pueden emplear, p. ej., PCR propensa a errores (Cadwell y Joyce, *PCR Methods Appl* 2:28 (1992)) o una forma alternativa de mutagénesis aleatoria, mutagénesis NNK como se describe más adelante, mutagénesis de revisión (en donde se diseñan polipéptidos de armazón de fibronectina con injerto de CDR para optimizar la unión a antígenos a través del uso de diversidad de CDR de ocurrencia natural; consúltese, p. ej., el documento WO-06/023144, incorporado en la presente memoria como referencia) y/u otros enfoques de mutagénesis reconocidos en la técnica para crear diversidad de polipéptidos, que se combina con una o más tandas de selección para afinidad de unión a antígenos.

20 Cualquiera de las proteínas de armazón descritas más adelante puede combinarse con otra para su uso, p. ej., en las composiciones de ligandos específicos dobles descritas en la presente memoria. Por ejemplo, puede injertarse CDR en un armazón de CTLA-4 y usarse junto con dominios de anticuerpos VH o VL para formar un ligando multivalente. Análogamente, pueden combinarse fibronectina, lipocalina, moléculas affibody y otros armazones.

Anexo 1; polipéptidos que potencian la semivida *in vivo*.

25 Alfa-1 Glucoproteína (Orosomucoide) (AAG)

Alfa-1 Antiquiromotripsina (ACT)

Alfa-1 Antitripsina (AAT)

Alfa-1 Microglobulina (Proteína HC) (AIM)

Alfa-2 Macroglobulina (A2M)

30 Antitrombina III (AT III)

Apolipoproteína A-1 (Apo A-1)

Apolipoproteína B (Apo B)

Beta-2-microglobulina (B2M)

Ceruloplasmina (Cp)

35 Componente de complemento (C3)

Componente de complemento (C4)

Inhibidor de C1 esterasa (C1 INH)

Proteína C-reactiva (PCR)

Cistatina C (Cys C)

40 Ferritina (FER)

Fibrinógeno (FIB)

Fibronectina (FN)

Haptoglobina (Hp)

Hemopexina (HPX)

Inmunoglobulina A (IgA)

Inmunoglobulina D (IgD)

Inmunoglobulina E (IgE)

Inmunoglobulina G (IgG)

5 Inmunoglobulina M (IgM)

Cadenas ligeras de inmunoglobulinas (kappa/lambda)

Lipoproteína(a) [Lp(a)]

Proteína de unión a manosa (MBP)

Mioglobina (Myo)

10 Plasminógeno (PSM)

Prealbúmina (Transtretina) (PAL)

Proteína de unión a retinol (RBP)

Factor reumatoide (RF)

Amiloide sérico A (SAA)

15 Receptor de transferrina soluble (sTfR)

Transferrina (Tf)

Anexo 2

Emparejamiento	Referencias de interés terapéutico.
TNF ALPHA/TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β y TNF cuando se inyectan en la articulación del tobillo del modelo de artritis inducido por colágeno mejoraron significativamente la inflamación articular. En ratones sin prueba de provocación con colágeno no se produjo ningún efecto.
TNF ALPHA/IL-1	<ul style="list-style-type: none"> • TNF e IL-1 actúan sinérgicamente en la afección de uveítis. • TNF e IL-1 actúan sinérgicamente en la enfermedad del paludismo (hipoglicemia, NO). • TNF e IL-1 actúan sinérgicamente en la inducción de migración de células polimorfonucleares (PMN) en caso de inflamación. • IL-1 y TNF actúan sinérgicamente para inducir infiltración de PMN en el peritoneo. • IL-1 y TNF actúan sinérgicamente para inducir la secreción de IL-1 por las células endoteliales. Importante en la inflamación. • IL-1 o TNF en solitario indujeron cierta infiltración celular en el líquido sinovial rotuliano. IL-1 indujo PMN, TNF - monocitos. En conjunto indujeron una inflamación más grave debida al aumento de PMN. • La sustancia depresora miocárdica circulante (presente en la sepsis) tiene niveles bajos de IL-1 y TNF que actúan sinérgicamente.
TNF ALPHA/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • En su mayoría relacionado con la activación sinérgica de linfocitos T citolíticos.
TNF ALPHA/IL-3	<ul style="list-style-type: none"> • Synergy of interleukin 3 and tumor necrosis factor alpha in stimulating clonal growth of acute myelogenous leukemia blasts is the result of induction of secondary hematopoietic cytokines by tumor necrosis factor alpha. • <i>Cancer Res.</i> 1992 Apr 15;52(8):2197-201.

TNF ALPHA/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • IL-4 y TNF actúan sinérgicamente para inducir expresión de VCAM en las células endoteliales. Se deriva que tienen una función en el asma. Lo mismo sucede para el líquido sinovial, que interviene en la AR. • TNF e IL-4 actúan sinérgicamente para inducir expresión de IL-6 en los queratinocitos. • Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. <i>Am J Pathol.</i> 1999 Apr;154(4):1149-58
TNF ALPHA/IL-5	<ul style="list-style-type: none"> • Relationship between the tumor necrosis factor system and the serum interleukin-4, interleukin-5, interleukin-8, eosinophil cationic protein, and immunoglobulin E levels in the bronchial hyperreactivity of adults and their children. <i>Allergy Asthma Proc.</i> 2003 Mar-Apr;24(2):111-8.
TNF ALPHA/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • TNF and IL-6 are potent growth factors for OH-2, a novel human myeloma cell line. <i>Eur J Haematol.</i> 1994 Jul;53(1):31-7.
TNF ALPHA/IL-8	<ul style="list-style-type: none"> • TNF e IL-8 actúan sinérgicamente con PMN para activar las plaquetas que intervienen en el síndrome de dificultad respiratoria aguda. • Véase IL-5/TNF (asma). Synergism between interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha for neutrophil-mediated platelet activation. <i>Eur Cytokine Netw.</i> 1994 Sep-Oct;5(5):455-60. (síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA))
TNF ALPHA/IL-9	
TNF ALPHA/IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • IL-10 induce y actúa sinérgicamente con TNF en la inducción de la expresión de VIH en linfocitos T infectados de forma crónica.
TNF ALPHA/IL-11	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. <i>Am J Physiol Cell Physiol.</i> 2002 Sep;283(3):C679-87. (Pérdida ósea)
TNF ALPHA/IL-12	
TNF ALPHA/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. <i>Am J Pathol.</i> 1999 Apr;154(4):1149-58. • Interleukin-13 and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. <i>Clin Exp Allergy.</i> 2000 Mar;30(3):348-55. • Interleukin-13 and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. <i>Clin Exp Allergy.</i> 2000 Mar;30(3):348-55 (inflamación alérgica) • Implications of serum TNF-beta and IL-13 in the treatment response of childhood nephrotic syndrome. <i>Cytokine.</i> 2003 Feb 7;21(3):155-9.
TNF ALPHA/IL-14	<ul style="list-style-type: none"> • Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. <i>Thorax.</i> 2002 Sep; 57(9):774-8.
TNF ALPHA/IL-15	<ul style="list-style-type: none"> • Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. <i>Thorax.</i> 2002 Sep;57(9):774-8.

TNF ALPHA/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor necrosis factor-alpha-induced synthesis of interleukin-16 in airway epithelial cells: priming for serotonin stimulation. <i>Am J Respir Cell Mol Biol.</i> 2003 Mar;28(3):354-62. (inflamación de las vías respiratorias) • Correlation of circulating interleukin 16 with proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis. <i>Rheumatology</i> (Oxford). 2001 Apr;40(4):474-5. No existe un resumen disponible. • Interleukin 16 is up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. <i>Gastroenterology.</i> 2000 Oct;119(4):972-82.
TNF ALPHA/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with <i>Borrelia burgdorferi</i>. <i>Infect Immun.</i> 2003 Jun;71(6):3437-42. • Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction <i>in vitro</i>. <i>Ann Rheum Dis.</i> 2002 Oct;61(10):870-6. • A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. <i>Eur Respir J.</i> 2003 Mar;21(3):387-93. (Inflamación de las vías respiratorias) • Resumen Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically upregulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. <i>Arthritis Rheum.</i> 2001 Sep;44(9):2078-83.
TNF ALPHA/IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1-beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. <i>Arthritis Rheum.</i> 2003 Feb;48(2):339-47. • Resumen Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. <i>Metabolism.</i> 2003 May;52(5):605-8.
TNF ALPHA/IL-19	<ul style="list-style-type: none"> • Resumen IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. <i>J Immunol.</i> 2002 Oct 15;169(8):4288-97.
TNF ALPHA/IL-20	<ul style="list-style-type: none"> • Resumen Cytokines: IL-20 - a new effector in skin inflammation. <i>Curr Biol.</i> 2001 Jul 10;11(13):R531-4
TNF ALPHA/Complement	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. <i>Clin Infect Dis.</i> 2003 May 15;36(10):1259-65. Epub 2003 May 08. Revisión.
TNF ALPHA/IFN-γ	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción de MHC en el encéfalo. • Sinergia en respuesta antiviral/inducción de IFN-β • Activación de neutrófilos / impulso respiratorio. • Activación de células endoteliales • Se observan toxicidades cuando los pacientes son tratados con TNF/IFN-γ como terapia antiviral • Expresión de fractalcina por astrocitos humanos. • Muchos artículos sobre respuestas inflamatorias, p. ej., LPS, también activación de macrófagos. • Anti-TNF y anti-IFN-γ actúan sinérgicamente para proteger a los ratones de una endotoxemia mortal.

ES 2 629 353 T3

TGF-β/IL-1	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de prostaglandinas por los osteoblastos • Producción de IL-6 por las células epiteliales intestinales (modelo de inflamación) • Estimula IL-11 e IL-6 en los fibroblastos de los pulmones (modelo de inflamación) • Producción de IL-6 e IL-8 en la retina
TGF-β/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación de condrosarcoma
IL-1/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de linfocitos B • Activación de linfocitos LAK • Activación de linfocitos T • IL-1 synergy with IL-2 in the generation of lymphokine activated killer cells is mediated by TNF-alpha and beta (lymphotoxin). <i>Cytokine</i>. 1992 Nov;4(6):479-87.
IL-1/IL-3	
IL-1/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de linfocitos B • IL-4 induce la expresión de IL-1 en activación de células endoteliales.
IL-1/IL-5	
IL-1/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de linfocitos B • Activación de linfocitos T (puede sustituir a células accesorias) • IL-1 induce la expresión de IL-6 • Expresión de amiloide en suero y C3 (respuesta en fase aguda) • Expresión de VIH • Descomposición del colágeno de los cartílagos.
IL-1/IL-7	<ul style="list-style-type: none"> • IL-7 is requisite for IL-1-induced thymocyte proliferation. Involvement of IL-7 in the synergistic effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or tumor necrosis factor with IL-1. <i>J Immunol</i>. 1992 Jan 1;148(1):99-105.
IL-1/IL-8	
IL-1/IL-10	
IL-1/IL-11	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. <i>Am J Physiol Cell Physiol</i>. 2002 Sep;283(3):C679-87. (Pérdida ósea)
IL-1/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Correlation of circulating interleukin 16 with proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis. <i>Rheumatology (Oxford)</i>. 2001 Apr;40(4):474-5. No se dispone de resumen.
IL-1/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with <i>Borrelia burgdorferi</i>. <i>Infect Immun</i>. 2003 Jun;71(6):3437-42. • Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. <i>Osteoarthritis Cartilage</i>. 2002 Oct;10(10):799-807. • Resumen Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically upregulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. <i>Arthritis Rheum</i>. 2001 Sep;44(9):2078-83.

ES 2 629 353 T3

IL-1/IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. <i>Arthritis Rheum.</i> 2003 Feb;48(2):339-47.
IL-1/IFN-g	
IL-2/IL-3	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación de linfocitos T • Proliferación de linfocitos B
IL-2/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación de linfocitos B • Proliferación de linfocitos T • (selectively inducing activation of CD8 and NK lymphocytes)IL-2R beta agonist P1-30 acts in synergy with IL-2, IL-4, IL-9, and IL-15: biological and molecular effects. <i>J Immunol.</i> 2000 Oct 15;165(8): 4312-8.
IL-2/IL-5	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación de linfocitos B/ secreción de Ig • IL-5 induce receptores de IL-2 en los linfocitos B
IL-2/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de linfocitos T citotóxicos
IL-2/IL-7	
IL-2/IL-9	<ul style="list-style-type: none"> • Véase IL-2/IL-4 (linfocitos NK)
IL-2/IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de linfocitos B
IL-2/IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. <i>Cell Immunol.</i> 1995 Oct 1;165(1):33-43. (Activación de linfocitos T)
IL-2/IL-15	<ul style="list-style-type: none"> • Véase IL-2/IL-4 (linfocitos NK)
	<ul style="list-style-type: none"> • (T cell activation and proliferation) IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells <i>in vivo.</i> <i>Nat Med.</i> 2001 Jan;7(1):114-8.
IL-2/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. <i>J Immunol.</i> 1998 Mar 1;160(5):2115-20.
IL-2/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. <i>J Pathol.</i> 2002 Jul;197(3):322-32.
IL-2/IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. <i>Blood.</i> 2002 Feb 15;99(4):1289-98.
IL-2/TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> • Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. <i>J Exp Med.</i> 1995 Sep 1;182(3):699-709.
IL-2/IFN-γ	<ul style="list-style-type: none"> • Secreción de Ig por linfocitos B • IL-2 induce expresión de IFN-γ por linfocitos T
IL-2/IFN-α/β	<ul style="list-style-type: none"> • Ninguno
IL-3/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Actúan sinérgicamente en el crecimiento de mastocitos • Synergistic effects of IL-4 and either GM-CSF or IL-3 on the induction of CD23 expression by human monocytes: regulatory effects of IFN-alpha and IFN-gamma. <i>Cytokine.</i> 1994 Jul;6(4):407-13.
IL-3/IL-5	
IL-3/IL-6	

ES 2 629 353 T3

IL-3/IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> IL-4 and IFN-gamma synergistically increase total polymeric IgA receptor levels in human intestinal epithelial cells. Role of protein tyrosine kinases. <i>J Immunol.</i> 1996 Jun 15;156(12):4807-14.
IL-3/GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. <i>J Immunol.</i> 2003 Jun 1;170(11):5359-66. (inflamación alérgica)
IL-4/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> IL-4 synergistically enhances both IL-2- and IL-12-induced IFN-γ expression in murine NK cells. <i>Blood.</i> 2003 Mar 13 [Epub ahead of print]
IL-4/IL-5	<ul style="list-style-type: none"> Potenciación de secreción de histamina, etc., en mastocitos como respuesta a IgE A Th2-like cytokine response is involved in bullous pemphigoid. the role of IL-4 and IL-5 in the pathogenesis of the disease. <i>Int J Immunopathol Pharmacol.</i> 1999 May-Aug;12(2):55-61.
IL-4/IL-6	
IL-4/IL-10	
IL-4/IL-11	<ul style="list-style-type: none"> Synergistic interactions between interleukin-11 and interleukin-4 in support of proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. <i>Blood.</i> 1991 Sep 15;78(6):1448-51.
IL-4/IL-12	<ul style="list-style-type: none"> Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. <i>J Immunol.</i> 2000 Jan 1;164(1):64-71. (increase Th1/Th2 differentiation) IL-4 synergistically enhances both IL-2- and IL-12-induced IFN-γ expression in murine NK cells. <i>Blood.</i> 2003 Mar 13 [Epub ahead of print]
IL-4/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> Resumen Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. <i>Science.</i> 2003 Jun 6;300(5625):1527-8. (alergia, asma) Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2003 Jun;111(6):1361-1369.
IL-4/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> (asma) Interleukin (IL)-4/IL-9 and exogenous IL-16 induce IL-16 production by BEAS-2B cells, a bronchial epithelial cell line. <i>Cell Immunol.</i> 2001 Feb 1;207(2):75-80
IL-4/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> Interleukin (IL)-4 and IL-17 synergistically stimulate IL-6 secretion in human colonic myofibroblasts. <i>Int J Mol Med.</i> 2002 Nov;10(5):631-4. (Gut inflammation)
IL-4/IL-24	<ul style="list-style-type: none"> IL-24 is expressed by rat and human macrophages. <i>Immunobiology.</i> 2002 Jul;205(3):321-34.
IL-4/IL-25	<ul style="list-style-type: none"> Resumen New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. <i>J Immunol.</i> 2002 Jul 1;169(1):443-53. (allergic inflammation) Resumen Mast cells produce interleukin-25 upon Fc-epsilon RI-mediated activation. <i>Blood.</i> 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (allergic inflammation)
IL-4/IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> Resumen Interleukin 4 induces interleukin 6 production by endothelial cells: synergy with interferon-gamma. <i>Eur J Immunol.</i> 1991 Jan;21(1):97-101.
IL-4/SCF	<ul style="list-style-type: none"> Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. <i>Immunol Rev.</i> 2001 Feb;179:57-60. Revisión.
IL-5/IL-3	<ul style="list-style-type: none"> Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. <i>J Immunol.</i> 2003 Jun 1;170(11):5359-66. (Inflamación alérgica,

	véase resumen)
IL-5/IL-6	
IL-5/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of allergic airways inflammation and airway hyperresponsiveness in mice by dexamethasone: role of eosinophils, IL-5, eotaxin, and IL-13. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2003 May; 111(5):1049-61.
IL-5/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. <i>Am J Respir Cell Mol Biol.</i> 2003 Jan; 28(1):42-50.
IL-5/IL-25	<ul style="list-style-type: none"> • Resumen New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. <i>J Immunol.</i> 2002 Jul 1; 169(1):443-53. (inflamación alérgica) • Resumen Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. <i>Blood.</i> 2003 May 1; 101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (inflamación alérgica)
IL-5/IFN-γ	
IL-5/GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> • Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. <i>J Immunol.</i> 2003 Jun 1; 170(11):5359-66. (Inflamación alérgica)
IL-6/IL-10	
IL-6/IL-11	
IL-6/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-16 stimulates the expression and production of proinflammatory cytokines by human monocytes. <i>Immunology.</i> 2000 May; 100(1):63-9.
IL-6/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. <i>J Biol Chem.</i> 2003 May 9; 278(19):17036-43. Epub 2003 Mar 06. (inflamación de las vías respiratorias, asma)
IL-6/IL-19	<ul style="list-style-type: none"> • Resumen IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. <i>J Immunol.</i> 2002 Oct 15; 169(8):4288-97.
IL-6/IFN-g	
IL-7/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. <i>Blood.</i> 2002 Oct 1; 100(7):2642-9.
IL-7/IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. <i>J Immunol.</i> 1995 May 15; 154(10):5093-102.
IL-7/IL-15	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. <i>Blood.</i> 2001 Nov 1; 98(9):2778-83. (factor de crecimiento)
IL-8/IL-11	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythaemia vera. <i>Cytokine.</i> 2002 Nov 21; 20(4):178-83.
IL-8/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • The Role of IL-17 in Joint Destruction. <i>Drug News Perspect.</i> 2002 Jan; 15(1):17-23. (artritis) • Resumen Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. <i>Am J Respir Cell Mol Biol.</i> 2002 Jun; 26(6):748-53. (inflamación de las vías respiratorias)
IL-8/GSF	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-8: an autocrine/paracrine growth factor for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factor-1 to promote monocyte-macrophage growth and differentiation. <i>Exp Hematol.</i> 1999 Jan; 27(1):28-36.
IL-8/VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant

	glioma. <i>J Neurooncol.</i> 2003 May; 62 (3):297-303.
IL-9/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. <i>Am J Respir Crit Care Med.</i> 2002 Aug 1;166(3):409-16.
IL-9/IL-5	<ul style="list-style-type: none"> • Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. <i>J Clin Invest.</i> 2002 Jan;109(1):29-39. • Th2 cytokines and asthma. Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma. <i>Respir Res.</i> 2001;2(2):80-4. Epub 2001 Feb 15. Revisión. • Resumen Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. <i>Blood.</i> 2000 Sep 15;96(6):2163-71 (asma)
IL-9/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. <i>Am J Respir Crit Care Med.</i> 2002 Aug 1;166(3):409-16.
	<ul style="list-style-type: none"> • Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. <i>Nat Med.</i> 2002 Aug;8(8):885-9.
IL-9/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Véase IL-4/IL-16
IL-10/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. <i>Cell Immunol.</i> 1994 Sep;157(2):478-88.
IL-10/IL-12	
IL-10/TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> • IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. <i>Eur J Immunol.</i> 2003 May;33(5):1205-14.
IL-10/IFN- γ	
IL-11/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. <i>Bone.</i> 2003 Jan;32(1):1-7. (resorción ósea en inflamación)
IL-11/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2003 Apr;111(4):875-81. (dermatitis alérgica) • IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. <i>J Immunol.</i> 2003 Mar 1;170(5):2655-62.
IL-11/TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> • Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2003 Apr;111(4):875-81. (dermatitis alérgica)
IL-12/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Relationship of Interleukin-12 and Interleukin-13 imbalance with class-specific rheumatoid factors and anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. <i>Clin Rheumatol.</i> 2003 May;22(2):107-11.
IL-12/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. <i>Scand J Gastroenterol.</i> 2003 Feb;38(2):180-5.
IL-12/IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. <i>Cytokine.</i> 1999 Nov;11(11):822-30. • Inflammatory Liver Steatosis Caused by IL-12 and IL-18. <i>J Interferon Cytokine Res.</i> 2003 Mar;23(3):155-62.

ES 2 629 353 T3

IL-12/IL-23	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. <i>Nature</i>. 2003 Feb 13;421(6924):744-8. • Resumen A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. <i>J Leukoc Biol</i>. 2003 Jan;73(1):49-56. Revisión.
IL-12/IL-27	<ul style="list-style-type: none"> • Resumen IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. <i>Immunity</i>. 2002 Jun;16(6):779-90.
IL-12/IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> • IL-12 induce la expresión de IFN-γ por linfocitos B y T como parte de la estimulación inmunitaria.
IL-13/IL-5	<ul style="list-style-type: none"> • Véase IL-5/IL-13
IL-13/IL-25	<ul style="list-style-type: none"> • Resumen New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. <i>J Immunol</i>. 2002 Jul 1;169(1):443-53. (inflamación alérgica) • Resumen Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. <i>Blood</i>. 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (inflamación alérgica)
IL-15/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Differential expression of interleukins (IL)-13 and IL-15 in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. <i>Am J Reprod Immunol</i>. 2003 Feb;49(2):75-83.
IL-15/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. <i>Exp Dermatol</i>. 2000 Aug;9(4):248-51.
IL-15/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Resumen IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. <i>J Immunol</i>. 2003 Feb 15;170(4):2106-12. (inflamación de las vías respiratorias)
IL-15/IL-21	<ul style="list-style-type: none"> • IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-gamma Production in Human NK and T Cells. <i>J Immunol</i>. 2003 Jun 1;170(11):5464-9.
IL-17/IL-23	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. <i>J Biol Chem</i>. 2003 Jan 17;278(3):1910-4. Epub 2002 Nov 03
IL-17/TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> • Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. <i>J Allergy Clin Immunol</i>. 2003 Apr;111(4):875-81. (dermatitis alérgica)
IL-18/IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. <i>Cytokine</i>. 1999 Nov;11(11):822-30. • Resumen Inhibition of in vitro immunoglobulin production by IL-12 in murine chronic graftvs.- host disease: synergism with IL-18. <i>Eur J Immunol</i>. 1998 Jun;28(6):2017-24.
IL-18/IL-21	<ul style="list-style-type: none"> • IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-gamma Production in Human NK and T Cells. <i>J Immunol</i>. 2003 Jun 1;170(11):5464-9.
IL-18/TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin 18 and transforming growth factor beta1 in the serum of patients with Graves' ophthalmopathy treated with corticosteroids. <i>Int Immunopharmacol</i>. 2003 Apr;3(4):549-52.
IL-18/IFN- γ	
Anti-TNF ALPHA/anti-CD4	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto terapéutico sinérgico en ratones artríticos DBA/1.

Anexo 3: Combinaciones de oncología

Diana	Enfermedad	Par con
CD89*	Uso como reclutador de células citotóxicas	todos
CD19	Linfomas de linfocitos B	HLA-DR CD5
HLA-DR	Linfomas de linfocitos B	CD89 CD19 CD5
CD38	Mieloma múltiple	CD138 CD56 HLA-DR
CD138	Mieloma múltiple	CD38 CD56 HLA-DR
CD138	Cáncer de pulmón	CD56 CEA
CD33	Linfoma mieloide agudo	CD34 HLA-DR
CD56	Cáncer de pulmón	CD138 CEA
CEA	Diversos carcinomas	Receptor MET
VEGF	Diversos carcinomas	Receptor MET
Receptor VEGF	Diversos carcinomas	Receptor MET
IL-13	Asma/inflamación pulmonar	IL-4 IL-5 Eotaxina(s) MDC TARC TNF α IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGF β
IL-4	Asma	IL-13

		IL-5 Eotaxina(s) MDC TARC TNF α IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGF β
Eotaxina	Asma	IL-5 Eotaxina-2 Eotaxina-3
EGFR	cáncer	HER2/neu HER3 HER4
HER2	cáncer	HER3 HER4
TNFR1	AR/enfermedad de Crohn	IL-1R IL-6R IL-18R
TNF α	AR/enfermedad de Crohn	IL-1 α/β IL-6 IL-18 ICAM-1 IL-15 IL-17
IL-1R	AR/enfermedad de Crohn	IL-6R IL-18R
IL-18R	AR/enfermedad de Crohn	IL-6R

Anexo 4

Resumen de datos

DIANA	dAb	Constante de disociación en equilibrio (Kd = Koff/Kon)	Koff	Ci50 para ensayo de ligando	DN50 para ensayo de neutralidad basado en células
TAR1	Monómeros TAR1	300 nM a 5 pM (p. ej., 3×10^{-7} a 5×10^{-12}), preferiblemente 50 nM a 20 pM	5×10^{-1} a 1×10^{-7}	500 nM a 100 pM	500 nM a 50 pM
	Dímeros TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1
	Trímeros TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1
	TAR1-5				
	TAR1-27				
	Monómero TAR1-5-19	30 nM			
	Homodímero TAR1-5-19				
				Con grupo enlazador (Gly ₄ Ser) ₃ = 20 nM Con grupo enlazador (Gly ₄ Ser) ₅ = 2 nM Con grupo enlazador (Gly ₄ Ser) ₇ = 10 nM En formato Fab = 1 nM	= 30 nM = 3 nM = 15 nM
	Heterodímeros TAR1-5-19			Con grupo enlazador (Gly ₄ Ser) _n TAR1-5-19 d2 = 2 nM TAR1-5-19 d3 = 8 nM TAR1-5-19 d4 = 2-5 nM TAR1-5-19 d5 = 8 nM En formato Fab TAR1-5-19CH d1CK = 6 nM TAR1-5-19CK d1CH = 6 nM TAR1-5-19CH d2CK = 8 nM	= 12 nM = 10 nM

				TAR1-5-19CH d3CK = 3 nM		= 12 nM
	Heterodímeros TAR1-5			Con grupo enlazador (Gly ₄ Ser) _n TAR1-5d1 = 30 nM TAR1-5d2 = 50 nM TAR1-5d3 = 300 nM TAR1-5d4 = 3 nM TAR1-5d5 = 200 nM TAR1-5d6 = 100 nM En formato Fab TAR1-5CH d2CK = 30 nM TAR1-5CK d3CH = 100 nM		= 60 nM
	Homodímero TAR1-5-19			0,3 nM		3-10 nM (p. ej., 3 nM)
TAR2	Monómeros TAR2	Como monómero TAR1	Como monómero TAR1	500 nM a 100 pM		500 nM a 50 pM
	TAR2-10					
	TAR2-5					
Albúmina sérica	Monómeros anti-SA	1 nM a 500 μM, preferiblemente 100 nM a 10 μM En formato específico doble, afinidad de diana es de 1 a 100.000 x afinidad dAb SA, p. ej. 100 pM (diana) y 10 μM afinidad SA.	1 nM a 500 μM, preferiblemente 100 nM a 10 μM En formato específico doble, afinidad de diana es de 1 a 100.000 x afinidad dAb SA, p. ej. 100 pM (diana) y 10 μM afinidad SA.	1 nM a 500 μM, preferiblemente 100 nM a 10 μM En formato específico doble, la afinidad de diana es de 1 a 100.000 x afinidad dAb SA, p. ej. 100 pM (diana) y 10 μM afinidad SA.		
	MSA-16			200 nM		
	MSA-26			70 nM		

Apéndice 1 - Listado de secuencias

HEL4

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F R
I S D E D M .

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT
TAGGATTAGC GATGAGGATA

. G W V R Q A P G K G L E W V S S I Y G P S G S T Y Y A D
S V K G R .

TGGGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTATCAAGC ATTTATGGCC CTAGCGGTAG CACATACTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

. F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
C A S A L

GTTCAACATC TCCCGTGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT
ATTATTGCGC GAGTGCTTTG

E P L S E P L G F W G Q G T L V T V S S
GAGCCGCTTT CGGAGCCCCT GGGCTTTTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC

TAR2-5

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T
F D L Y N M .

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT
CACCTTTGAT CTTTATAATA

. F W V R Q A P G K G L E W V S F I S Q T G R L T W Y A D
S V K G R .

TGTTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATTT ATTAGTCAGA CTGGTAGGCT TACATGGTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

. F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y
C A K T L

GTTCAACATC TCCCGGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT
ATTACTGTGC GAAAACGCTG

E D F D Y W G Q G T L V T V S S
GAGGATTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC

TAR1-5-19

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S
V K E F L W .

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA
GAGCGTTAAG GAGTTTTTAT

ES 2 629 353 T3

· W Y Q Q K P G K A P K L L I Y M A S N L Q S G V P S R
F S G S G S ·

GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATATG GCATCCAATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
CGTTTCAGTG GCAGTGGATC

· G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K F K L P
R T F G Q

TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTTTAAGC
TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA

G T K V E I K R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

TAR2-10

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGT
GCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGTGGTATTGGATGGGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGT
CTAGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
CGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCC
GAGGACACCCGGTATATTACTGTGCGAAAAGTTAAGTTGGGGGGGGGCCTAATTTTACTACTGG
GGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCGAGCGCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFEWYWM
GWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKVK
LGGGPNFDYWGQTLVTVSS

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S ·

1 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC

· L R L S C A A S G F T F E W Y W M ·

51 CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGATT CACCTTTGAG TGGTATTGGA

· G W V R Q A P G K G L E W V S A

101 TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT

I S G S G G S T Y Y A D S V K G R ·

151 ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

· F T I S R D N S K N T L Y L Q M N ·

201 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA

· S L R A E D T A V Y Y C A K V K

251 ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTTAAG

L G G G P N F D Y W G Q G T L V T ·

301 TTGGGGGGGG GGCCTAATTT TGA TACTACTGG GGCCAGGAA CCCTGGTCAC

AvaI

~~~~~

· V S S

351 CGTCTCGAGC

## ES 2 629 353 T3

Secuencias de ADN y aminoácidos de dAb de TAR-1.

Los dAbs 1, 2 y 3 son las secuencias asociadas de los dímeros 1-6 de TAR1-5. DAb1 es el dAb asociado a los dímeros 1, 5 y 6

Los segundos dAb son iguales, pero las longitudes de los enlazadores son diferentes, asimismo, dAb2 es el dAb asociado a los dímeros 2 y 3, dAb3 es el dAb asociado al dímero 4. \* indica la presencia de un codón de parada ámbar. La homología de secuencia entre TAR1 -5, TAR1-5-19 y el único segundo dAbs es 88%

### TAR1-5-19

```

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S
Q S I D S Y L H
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCT CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC
GGGCAAGTCA GAGCATTGAT AGTTATTTAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGA GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG
CCCGTTCAGT CTCGTAAC TAATAAAATG
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S E L Q S G V P
S R F S G S G S
ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGT GCATCCGAGT TGCAAAGTGG
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTTCGAGGA CTAGATATCA CGTAGGCTCA ACGTTTCACC
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V V
W R P F T F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG
GTTGTGTGGC GTCCTTTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC
CAACACACCG CAGGAAAATG CAAGCCGGTT
G T K V E I K R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCG

```

### TAR1-5

```

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A
S Q S I F M N L L
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC
GGGCAAGTCA GAGCATT TTTT ATGAATTTAT
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG
CCCGTTCAGT CTCGTA AAAA TACTTAAATA
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N A S V L Q S G V
P S R F S G S G S
TGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCATCCGTGT TGCAAAGTGG
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
ACACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTTCGAGGA CTAGATATTA CGTAGGCACA ACGTTTCACC
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V V
W R P F T F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG
GTTGTGTGGC GTCCTTTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC
CAACACACCG CAGGAAAATG CAAGCCGGTT
G T K V E I K R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

```

ES 2 629 353 T3

Monómero - dAb1: DAb asociado en TAR1-5d1 (enlazador 3U), d5 (enlazador 5U), d6 (enlazador 7U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I Y D A L E  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGCACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTAT GATGCGTTAG  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAAATA CTACGCAATC  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T A S R L Q S G V P  
S R F S G S G S  
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATACT GCATCCCGGT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTGAGGA CTAGATATGA CGTAGGGCCA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V M  
Q R P V T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
GTTATGCAGC GTCCTGTTAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
CAATACGTCG CAGGACAATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero - dAb2: DAb asociado en TAR1-5d2 (enlazador 3U), d3 (enlazador 5U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I Y D A L \*  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGCACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTAT GATGCTTTAC  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAAATA CTACGAAATG  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T A S R L Q S G V P  
S R F S G S G S  
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATACT GCATCCCGGT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTGAGGA CTAGATATGA CGTAGGGCCA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y H C Q Q V M  
Q R P V T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACCA CTGTCAACAG  
GTTATGCAGC GTCCTGTTAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGGT GACAGTTGTC  
CAATACGTCG CAGGACAATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero - dAb3: DAb asociado en TAR1-5d4 (enlazador 5U)

ES 2 629 353 T3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S V K E F L W  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
GGCAAGTCA GAGCGTTAAG GAGTTTTAT  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGCAATTC CTCAAAAATA  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y M A S N L Q S G V P  
S R F S G S G S  
GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATATG GCATCCAATT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
CCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATAC CGTAGGTAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K F  
K L P R T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
AAGTTTAAGC TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA  
**ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC**  
TTCAAATTCG ACGGAGCATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

TAR1 - 27 y secuencias de aminoácidos y ADN de dAb asociadas (\* indica la presencia de un codón de parada ámbar). La homología de la secuencia entre TAR1 - 27 y el segundo dAbs único es 90,4%.

TAR1-27

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I W T K L H  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
GGCAAGTCA GAGCATTGAC ACGAAGTTAC  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAACC TGCTTCAATG  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y M A S S L Q S G V P  
S R F S G S G S  
ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATATG GCATCCAGTT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATAC CGTAGGTCAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W F  
S N P S T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
TGGTTTAGTA ATCCTAGTAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
ACCAAATCAT TAGGATCATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC  
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d1 (enlazador 3U)

ES 2 629 353 T3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
 S Q S I G \* D L H  
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
 GGGCAAGTCA GAGCATTGGG TAGGATTTAC  
 CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
 CCCGTTTCAGT CTCGTAACCC ATCCTAAATG  
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T A S L L Q S G V P  
 S R F S G S G S  
 ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATACG GCATCCCTTT TGCAAAGTGG  
 GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
 TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTTCGGG GATTTCGAGGA CTAGATATGC CGTAGGGAAA ACGTTTCACC  
 CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Q S  
 A F P N T L G Q  
 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTA CTA CTGTCAACAG  
 CAGAGTGCTT TTCCTAATAC GCTCGGCCAA  
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
 GTCTCACGAA AAGGATTATG CGAGCCGGTT  
 G T K V E I K R  
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
 CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d2 (enlazador 3U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
 S Q S I G \* D L H  
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
 GGGCAAGTCA GAGCATTGGG TAGGATTTAC  
 CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
 CCCGTTTCAGT CTCGTAACCC ATCCTAAATG  
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T A S L L Q S G V P  
 S R F S G S G S  
 ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATACG GCATCCCTTT TGCAAAGTGG  
 GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
 TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTTCGGG GATTTCGAGGA CTAGATATGC CGTAGGGAAA ACGTTTCACC  
 CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Q S  
 A F P N T L G Q  
 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTA CTA CTGTCAACAG  
 CAGAGTGCTT TTCCTAATAC GCTCGGCCAA  
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
 GTCTCACGAA AAGGATTATG CGAGCCGGTT  
 G T K V E I K R  
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
 CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d7 (enlazador 3U)

ES 2 629 353 T3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I T K N L L  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CCGTAGGAGA CCGTGTCCACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATAACG AAGAATTTAC  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GGCATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTATTGC TTCTTAAATG  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y \* A S S L Q S G V P  
S R F S G S G S  
TTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAG GCATCCTCTT TGCAAAGTGG  
**GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC**  
AAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAATC CGTAGGAGAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q L R  
H K P P T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
CTTCGTCATA AGCCTCCGAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
GAAGCAGTAT TCGGAGGCTG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
**CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC**

Monómero dAb asociado en TAR1-27d8 (enlazador 3U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I \* K S L R  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTAG AAGTCTTTAA  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAAATC TTCAGAAATT  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y H A S D L Q S G V P  
S R F S G S G S  
GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT GCATCCGATT TGCAAAGTGG  
**GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC**  
CCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAGTA CGTAGGCTAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q M V  
N S P V T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
ATGGTTAATA GTCCTGTTAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
TACCAATTAT CAGGACAATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
**CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC**

Monómero dAb asociado en TAR1-27d12 (enlazador 3U)

ES 2 629 353 T3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I \* T A L H  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTAG ACGGCGTTAC  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAAATC TGCCGCAATG  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S S L Q S G V P  
S R F S G S G S  
ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTCT GCATCCAGTT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAGA CGTAGGTCAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S S  
F L P F T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
TCGAGTTTTT TGCTTTTAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
AGCTCAAAAA ACGGAAAATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d16 (enlazador 3U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I G P N L E  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTGGG CCGAATTTAG  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAACCC GGCTTAAATC  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P  
S R F S G S G S  
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCAGTT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACGA CGTAGGTCAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Q M  
G R P R T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
CAGATGGGGC GTCCTCGGAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
GTCTACCCCG CAGGAGCCTG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d23 (enlazador 5U)

ES 2 629 353 T3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I K H \* L A  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTAAAG CATTAGTTAG  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAATTC GTAATCAATC  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y K A S V L Q S G V P  
S R F S G S G S  
CTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCGTGT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
GAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATTC CGTAGGCACA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q L R  
R R P T T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
CTTAGGCGTC GTCCTACTAC GTTCGGCCAA

ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
GAATCCGCAG CAGGATGATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGGTTC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d30 (enlazador 7U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S V K A \* L T  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCGTAAAG GCTTAGTTAA  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGCAATTC CGAATCAATC  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y K A S T L Q S G V P  
S R F S G S G S  
CTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCACTT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
GAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATTC CGTAGGTGAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H S  
S R P Y T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
CATAGTTCTA GGCCTTATAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
GTATCAAGAT CCGGAATATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGGTTC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d31 (enlazador 7U)

# ES 2 629 353 T3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I M D K L K  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTATG GATAAGTTAA  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAATAC CTATTCAATT  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y \* A S I L Q S G V P  
S R F S G S G S  
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAG GCATCCATTT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTTCGAGGA CTAGATAATC CGTAGGTAAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q D S  
G G P N T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
GATAGTGGGG GTCCTAATAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
CTATCACCCC CAGGATTATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

## Monómero dAb asociado en TAR1-27d36 (enlazador 7U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
S Q S I M D K L K  
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC ATCACTTGCC  
GGGCAAGTCA GAGCATTATG GATAAGTTAA  
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
CCCGTTCAGT CTCGTAATAC CTATTCAATT  
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y \* A S I L Q S G V P  
S R F S G S G S  
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAG GCATCCATTT TGCAAAGTGG  
GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTTCGAGGA CTAGATAATC CGTAGGTAAA ACGTTTCACC  
CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q D S  
G G P N T F G Q  
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
GATAGTGGGG GTCCTAATAC GTTCGGCCAA  
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
CTATCACCCC CAGGATTATG CAAGCCGGTT  
G T K V E I K R  
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
CCCTGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

## Monómero dAb asociado en TAR1-27d37 (enlazador 7U)

ES 2 629 353 T3

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
 S Q S I G R N L E  
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC ATCACTTGCC  
 GGGCAAGTCA GAGCATTGGG AGGAATTTAG  
 CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
 CCCGTTTCAGT CTCGTAACCC TCCTTAAATC  
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S H L Q S G V P  
 S R F S G S G S  
 AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCATCCCAT TGC AAAGTGG  
 GTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC

TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACTA CGTAGGGTAA ACGTTTCACC  
 CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S R  
 W L P R T F G Q  
 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
 TCGCGTTGGC TTCCTCGTAC GTTCGGCCAA  
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
 AGCGCAACCG AAGGAGCATG CAAGCCGGTT  
 G T K V E I K R  
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
 CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monómero dAb asociado en TAR1-27d39 (enlazador 7U)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A  
 S Q S I R K M L V  
 GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC ATCACTTGCC  
 GGGCAAGTCA GAGCATTAGG AAGATGTTAG  
 CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG  
 CCCGTTTCAGT CTCGTAATCC TTCTACAATC  
 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R A S Y L Q S G V P  
 S R F S G S G S  
 TTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG GCATCCTATT TGC AAAGTGG  
 GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC  
 AAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAGCC CGTAGGATAA ACGTTTCACC  
 CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG  
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A F  
 R R P R T F G Q  
 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG  
 GCTTTTCGGC GGCCTAGGAC GTTCGGCCAA  
 ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC  
 CGAAAAGCCG CCGGATCCTG CAAGCCGGTT  
 G T K V E I K R  
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG  
 CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Secuencias de aminoácidos y de ADN de TAR2 dAb (\* indica la presencia de un codón de parada ámbar) La homología de secuencia entre el TAR2h-5 y el segundo dAbs único es del 83,5%

TAR2h-5

ES 2 629 353 T3

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
G F T F D L Y N M

GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATAATA

CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
GGAGGCCTAA GTGGAAACTA GAAATATTAT

F W V R Q A P G K G L E W V S F I S Q T G R L T W  
Y A D S V K G R

TGTTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATT ATTAGTCAGA CTGGTAGGCT  
TACATGGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

ACAAAACCCA GCGGTCCGA GGTCCCTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAAA TAATCAGTCT GACCATCCGA  
ATGTACCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC

F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
V Y Y C A K T L

GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGCTG

CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGTGCGAC

E D F D Y W G Q G T L V T V S  
GAGGATTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCG  
CTCCTAAAC TGATGACCCC GGTCCCTGG GACCAGTGGC AGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d1 (enlazador 3U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
G F T F P V Y M M

GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
CCTCCGGATT CACCTTTCCG GTTTATATGA

CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
GGAGGCCTAA GTGGAAAGGC CAAATATACT

G W V R Q A P G K G L E W V S S I D A L G G R T G  
Y A D S V K G R

TGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGATGCTC TTGGTGGGCG  
GACAGGTTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

ACCCAACCCA GCGGTCCGA GGTCCCTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAGC TAACTACGAG AACCACCCGC  
CTGTCCAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC

F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
V Y Y C A K T M

GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACATATG

**CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG**  
TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGTGATA

S N K T H T F D Y W G Q G T L V T V S  
TCGAATAAGA CGCATACTGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
AGCTTATTCT GCGTATGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d2 (enlazador 3U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
G F T F V A Y N M

ES 2 629 353 T3

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
CCTCCGGATT CACCTTTGTG GCTTATAATA

CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
GGAGGCCTAA GTGGAAACAC CGAATATTAT

T W V R Q A P G K G L E W V S S I N T F G N \* T R  
Y A D S V K G R

TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTAATACTT TTGGTAATTA  
GACAAGGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

ACTGAAACCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAATTATGAA AACCATTAAT  
CTGTTCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC

F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
V Y Y C A K G S

GTTCCACATC TCCCAGCACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTAGT

CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTCCATCA

R P F D Y W G Q G T L V T V S  
AGGCCTTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGATCACCG TCTCG  
TCCGAAAAC TGATGACCCC GGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d3 (enlazador 3U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
G F T F \* G Y R M

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
CCTCCGGATT CACCTTTTAG GGTATACGTA

CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
GGAGGCCTAA GTGGAAAATC CCCATAGCAT

G W V R Q A P G K G L E W V S W I T R T G G T T Q  
Y A D S V K G R

TGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTACGCGTA CTGGTGGGAC  
GACACAGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

ACCCAACCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTACC TAATGCGCAT GACCACCCTG  
CTGTGTCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC

F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
V Y Y C A K P A

GTTCCACATC TCCCAGCACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGCG

CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGGCCGC

K L V G V G F D Y W G Q G T L V T V S  
AAGCTTGTG GGGTGGGT TGACTACTGG GGCCAGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
TTCAACAAC CCCAACCAA ACTGATGACC CCGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d4 (enlazador 3U)

ES 2 629 353 T3

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
 G F T F R K Y \* M  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CACCTTTCGG AAGTATTAGA  
 CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GTGGAAAGCC TTCATAATCT  
 G W V R Q A P G K G L E W V S Q I G A K G Q S T D  
 Y A D S V K G R  
 TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACAG ATTGGTGCAG AGGTCAGTC  
 TACAGATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACCCCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTGTG TAACCACGCT TCCCAGTCAG  
 ATGTCTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K K K  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGAAG  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCCGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTCTTC  
 R G E N Y F F D Y W G Q G T L V T V S  
 AGGGGGGAGA ATTATTTTTT TGACTIONTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
 TCCCCCTCT TAATAAAAAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d5 (enlazador 3U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
 G F T F R R Y S M  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CACCTTTCGG CGGTATAGTA  
 CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GTGGAAAGCC GCCATATCAT  
 S W V R Q A P G K G L E W V S D I S R S G R Y T H  
 Y A D S V K G R  
 TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGAT ATTTCTCGTT CTGGTCGGTA  
 TACACATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACAGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCTA TAAAGAGCAA GACCAGCCAT  
**ATGTGTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC**  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K R I  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGTATT  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCCGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGCATAA  
 D S S Q N G F D Y W G Q G T L V T V S  
 GATTCTTCTC AGAATGGGTT TGACTIONTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
 CTAAGAAGAG TCTTACCCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d6 (enlazador 3U)

ES 2 629 353 T3

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
 G F T F \* G Y K M  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CACCTTTTAG GGGTATAAGA  
 CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GTGGAAAATC CCCATATTCT  
 F W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y  
 Y A D S V K G R  
 TGTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG  
 CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACAAACCCA GCGCGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGA TAATCACCAT CACCACCATC  
 GTGTATGATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K Q K  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAG  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTGCGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGTCTTC  
 E N F D Y W G Q G T L V T V S  
 GAGAATTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCG  
 CTCCTAAAC TGATGACCCC GGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d7 (enlazador 3U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
 G F T F G D Y A M  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CACCTTTGGG GATTATGCTA  
 CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GTGGAAACCC CTAATACGAT  
 W W V R Q A P G K G L E W V S V I S S N G G S T F  
 Y A D S V K G R  
 TGTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGTG ATTAGTTCGA ATGGTGGGAG  
 TACATTTTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACACCACCCA GCGCGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCAC TAATCAAGCT TACCACCCTC  
 ATGTAAAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K R V  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGTGTT  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTGCGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGCACAA  
 R K R T P E F D Y W G Q G T L V T V S  
 CGTAAGAGGA CTCCTGAGTT TGA TACTG GGCAGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d8 (enlazador 3U)

# ES 2 629 353 T3

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
G F T F R R Y K M  
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
CCTCCGGATT CACCTTTAGG AGGTATAAGA  
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
GGAGGCCTAA GTGGAAATCC TCCATATTCT  
G W V R Q A P G K G L E W V S A I G R N G T K T N  
Y A D S V K G R  
TGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCG ATTGGGAGGA ATGGTACGAA  
GACAAATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
ACCCAACCCA GCGCGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGC TAACCCTCCT TACCATGCTT  
CTGTTTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
V Y Y C A K I Y  
GTTCCACATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAATTTAT  
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTAATA  
T G K P A A F D Y W G Q G T L V T V S  
ACGGGGAAGC CTGCTGCGTT TGACTIONTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
TGCCCTTCG GACGACGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

## Monómero dAb asociado en TAR2h-5d9 (enlazador 3U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
G F T F K K Y \* M  
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
CCTCCGGATT CACCTTTAAG AAGTATTAGA  
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
GGAGGCCTAA GTGGAAATTC TTCATAATCT  
S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y  
Y A D S V K G R  
TGTCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG  
CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
ACAGAACCCA GCGCGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGA TAATCACCAT CACCACCATC  
GTGTATGATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
V Y Y C A K M L  
GTTCCACATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAATGCTG  
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTACGAC  
R T K N K V P D Y W G Q G T L V T V S  
AGGACTAAGA ATAAGGTGTT TGACTIONTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
TCCTGATTCT TATTCCACAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

## Monómero dAb asociado en TAR2h-5d10 (enlazador 5U)

ES 2 629 353 T3

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
 G F T F R R Y K M  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CACCTTTAGG AGGTATAAGA  
 CTCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTGC GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GTGGAAATCC TCCATATTCT  
 G W V R Q A P G K G L E W V S A I G R N G T K T N  
 Y A D S V K G R  
 TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCG ATTGGGAGGA ATGGTACGAA  
 GACAAATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGC TAACCCCTCCT TACCATGCTT  
 CTGTTTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K I Y  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAATTTAT  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTAAATA  
 T G K P A A F D Y W G Q G T L V T V S  
 ACGGGGAAGC CTGCTGCGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
 TGCCCTTCG GACGACGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d11 (enlazador 5U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
 G F T F \* S Y R M  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CACCTTTTAG AGTTATCGGA  
 CTCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTGC GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GTGGAAAATC TCAATAGCCT  
 G W V R Q A P G K G L E W V S S I S S R G R H T S  
 Y A D S V K G R  
 TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTTTCGTCGA GGGGTAGGCA  
 TACATCTTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAAAGCAGCT CCCCATCCGT  
 ATGTAGAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K R V  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGGGTT  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTCCCAA  
 P G R G R S F D Y W G Q G T L V T V S  
 CCGGGTCGGG GGCGTTCTTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
 GGCCAGCCC CCGCAAGAAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d12 (enlazador 5U)

ES 2 629 353 T3

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
 G F P F R R Y R M  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CCCCTTTCGT CGGTATCGGA  
 CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTGC GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GGGGAAAGCA GCCATAGCCT  
 R W V R Q A P G K G L E W V S G I S P G G K H T T  
 Y A D S V K G R  
 TGAGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGT ATTTCTCCGG GTGGTAAGCA  
 TACAACGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACTCCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCCA TAAAGAGGCC CACCATTCTG  
 ATGTTGCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K G E  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTGAG  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTCCACTC  
 G G A S S A F D Y W G Q G T L V T V S  
 GGGGGGCGA GTTCTGCGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
 CCCCCCGCT CAAGACGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Monómero dAb asociado en TAR2h-5d13 (enlazador 5U)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S  
**G F T F \* R Y G M**  
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG  
 CCTCCGGATT CACCTTTTAG CGGTATGGGA  
 CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTGC GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC  
 GGAGGCCTAA GTGAAAATC GCCATACCCT  
 V W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y  
 Y A D S V K G R  
 TGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG  
 CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG  
 ACCAAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGA TAATCACCAT CACCACCATC  
 GTGTATGATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC  
 F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A  
 V Y Y C A K R H  
 GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC  
 ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGGCAT  
 CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG  
 TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGCCGTA  
 S S E A R Q F D Y W G Q G T L V T V S  
 AGTTCAGG CTAGGCAGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG  
 TCAAGACTCC GATCCGTCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

**REIVINDICACIONES**

1. Un ligando que comprende un dominio variable individual de anticuerpos, en donde dicho dominio variable individual de anticuerpos comprende la secuencia de aminoácidos de dAb7h11 que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 24, Hoja 1, o una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la misma al menos en el 95 %, en donde la semivida beta T del dominio variable individual en cynomolgus es al menos el 50 % de la semivida beta T de albúmina sérica de cynomolgus en cynomolgus.
2. Un ligando según la reivindicación 1, en donde el dominio variable individual de anticuerpos se une a la albúmina sérica de rata, ratón, ser humano y *Cynomolgus*.
3. Un ligando según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho dominio variable individual de anticuerpos se une específicamente a albúmina sérica humana y a albúmina sérica no humana con valores de Kd en los límites de un factor de 10 entre sí.
4. Un ligando según cualquier reivindicación precedente que comprende además un polipéptido biológicamente activo.
5. Un ligando según cualquier reivindicación precedente en donde dicho dominio variable individual de anticuerpos está conjugado con un fármaco.

FIG. 13

Secuencia V<sub>H</sub> de entrenamiento para biblioteca 1

```

1   E V Q L L E S G G G L V Q P G G
    GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
    CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

49  S L R L S C A A S G F T F S S Y
    TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
    AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CCG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

97  A M S W V R Q A P C K G L E W V
    GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
    CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

145 S A I S G S G G S T Y Y A D S V
    TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
    AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

193 K G R F T I S R D N S K N T L Y
    AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
    TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

241 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
    CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
    GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CCG CTC CTG TGG CCG CAT ATA ATG ACA

289 A K S Y G A F D Y W G Q G T L V
    GCG AAA AGT TAT GGT GCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
    CGC TTT TCA ATA CCA CGA AAA CTG ATG ACC CCG GTC CCT TGG GAC CAG

337 T V S S
    ACC GTC TCG AGC
    TGG CAG AGC TCG
    
```

FIG. 14

Secuencia V<sub>H</sub> de entrenamiento para biblioteca 2

```

1   E V Q L L E S G G G L V Q P G G
   GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
   CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

49  S L R L S C A A S G F T F S S Y
   TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
   AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

97  A M S W V R Q A P G K G L E W V
   GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
   CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

145 S A I S G S G G S T Y Y A D S V
   TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
   AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

193 K G R F T I S R D N S K N T L Y
   AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
   TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

241 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
   CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
   GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

289 A K S Y G A X X X X F D Y W G Q
   GCG AAA AGT TAT GGT GCT NNK NNK NNK NNK TTT GAC TAC TGG GGC CAG
   CGC TTT TCA ATA CCA CGA NNK NNK NNK NNK AAA CTG ATG ACC CCG GTC

337 G T L V T V S S
   GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC
   CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGC TCG
    
```

FIG. 15

Secuencia V<sub>k</sub> de entrenamiento para biblioteca 3

|     |     |            |     |     |            |     |     |     |     |     |            |            |            |            |            |            |
|-----|-----|------------|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1   | D   | I          | Q   | M   | T          | Q   | S   | P   | S   | S   | L          | S          | A          | S          | V          | G          |
|     | GAC | ATC        | CAG | ATG | ACC        | CAG | TCT | CCA | TCC | TCC | CTG        | TCT        | GCA        | TCT        | GTA        | GGA        |
|     | CTG | TAG        | GTC | TAC | TGG        | GTC | AGA | GGT | AGG | AGG | GAC        | AGA        | CGT        | AGA        | CAT        | CCT        |
| 49  | D   | R          | V   | T   | I          | T   | C   | R   | A   | S   | Q          | S          | I          | <u>S</u>   | <u>S</u>   | <u>Y</u>   |
|     | GAC | CGT        | GTC | ACC | ATC        | ACT | TGC | CGG | GCA | AGT | CAG        | AGC        | ATT        | <u>AGC</u> | <u>AGC</u> | <u>TAT</u> |
|     | CTG | GCA        | CAG | TGG | TAG        | TGA | ACG | GCC | CGT | TCA | GTC        | TCG        | TAA        | <u>TCG</u> | <u>TCG</u> | <u>ATA</u> |
| 97  | L   | <u>N</u>   | W   | Y   | Q          | Q   | K   | P   | G   | K   | A          | P          | K          | L          | L          | I          |
|     | TTA | <u>AAI</u> | TGG | TAC | CAG        | CAG | AAA | CCA | GGG | AAA | GCC        | CCT        | AAG        | CTC        | CTG        | ATC        |
|     | AAT | <u>TTA</u> | ACC | ATG | GTC        | GTC | TTT | GGT | CCC | TTT | CGG        | GGA        | TTC        | GAG        | GAC        | TAG        |
| 145 | Y   | <u>A</u>   | A   | S   | <u>S</u>   | L   | Q   | S   | G   | V   | P          | S          | R          | F          | S          | G          |
|     | TAT | <u>GCT</u> | GCA | TCC | <u>AGT</u> | TTG | CAA | AGT | GGG | GTC | CCA        | TCA        | CGT        | TTC        | AGT        | GGC        |
|     | ATA | <u>CGA</u> | CGT | AGG | <u>TCA</u> | AAC | GTT | TCA | CCC | CAG | GGT        | AGT        | GCA        | AAG        | TCA        | CCG        |
| 193 | S   | G          | S   | G   | T          | D   | F   | T   | L   | T   | I          | S          | S          | L          | Q          | P          |
|     | AGT | GGA        | TCT | GGG | ACA        | GAT | TTC | ACT | CTC | ACC | ATC        | AGC        | AGT        | CTG        | CAA        | CCT        |
|     | TCA | OCT        | ACA | CCC | TGT        | CTA | AAG | TGA | GAG | TGG | TAG        | TCG        | TCA        | GAC        | GTT        | GGA        |
| 241 | E   | D          | F   | A   | T          | Y   | Y   | C   | Q   | Q   | <u>S</u>   | <u>Y</u>   | <u>S</u>   | <u>T</u>   | P          | <u>N</u>   |
|     | GAA | GAT        | TTT | GCT | ACG        | TAC | TAC | TGT | CAA | CAG | <u>AGT</u> | <u>TAC</u> | <u>AGT</u> | <u>ACC</u> | CCT        | <u>AAT</u> |
|     | CTT | CTA        | AAA | CGA | TGC        | ATG | ATG | ACA | CTT | CTC | <u>TCA</u> | <u>ATG</u> | <u>TCA</u> | <u>TGG</u> | GGA        | <u>TTA</u> |
| 289 | T   | F          | G   | Q   | G          | T   | K   | V   | E   | I   | K          | R          |            |            |            |            |
|     | ACG | TTC        | GGC | CAA | GGG        | ACC | AAG | GTG | GAA | ATC | AAA        | CGG        |            |            |            |            |
|     | TGC | AAG        | CCG | GTT | CCC        | TGG | TTC | CAC | CTT | TAG | TTT        | GCC        |            |            |            |            |

FIG. 16

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de dAb anti MSA MSA 16 y MSA 26

**A: MSA 16**

```

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
D I Q M T Q S P S S L S A S
CTA CGA CAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
V G D R V T I T C R A S Q S
ATT ATT AAG CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
I I K H L K W Y Q Q K P G K
GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC CGG TTG CAA AGT
A P K L L I Y G A S R L Q S
GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
G V P S R F S G S G S G T D
TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
F T L T I S S L Q P E D F A
ACG TAC TAC TGT CAA CAG GGG GCT CGG TGG CCT CAG ACG TTC
T Y Y C Q Q G A R W P Q T F
GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
G Q G T K V E I K R
    
```

**B: MSA 26**

```

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
D I Q M T Q S P S S L S A S
GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
V G D R V T I T C R A S Q S
ATT TAT TAT CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
I Y Y H L K W Y Q Q K P G K
GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCC ACG TTG CAA AGT
A P K L L I Y K A S T L Q S
GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
G V P S R F S G S G S G T D
TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
F T L T I S S L Q P E D F A
ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT CCG AAG GTG CCT CGG ACG TTC
T Y Y C Q Q V R K V P R T F
GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
G Q G T K V E I K R
    
```

FIG. 17

Inhibición Biacore de MSA16

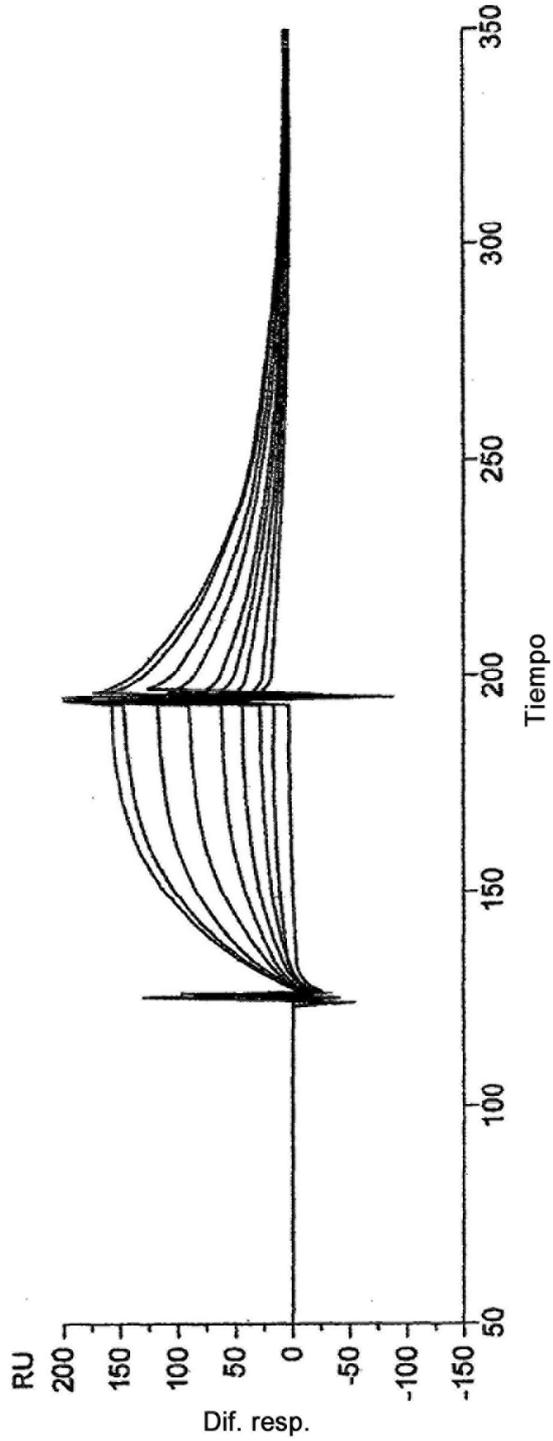
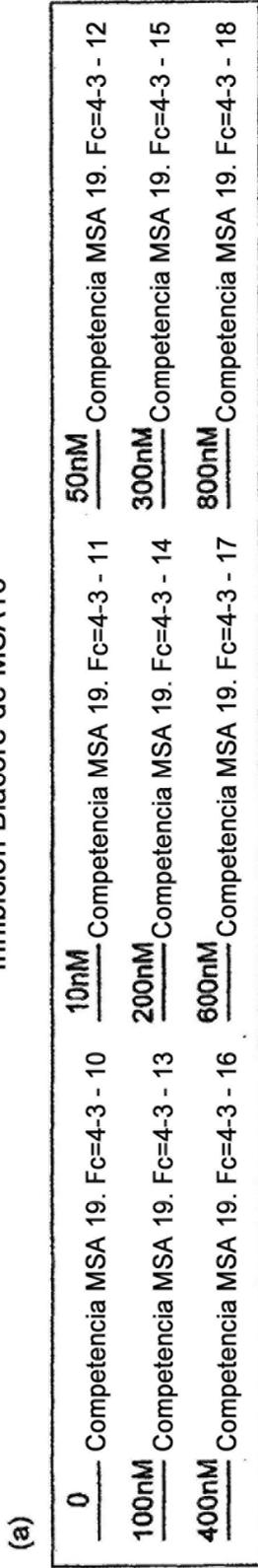


FIG. 17 (cont.)

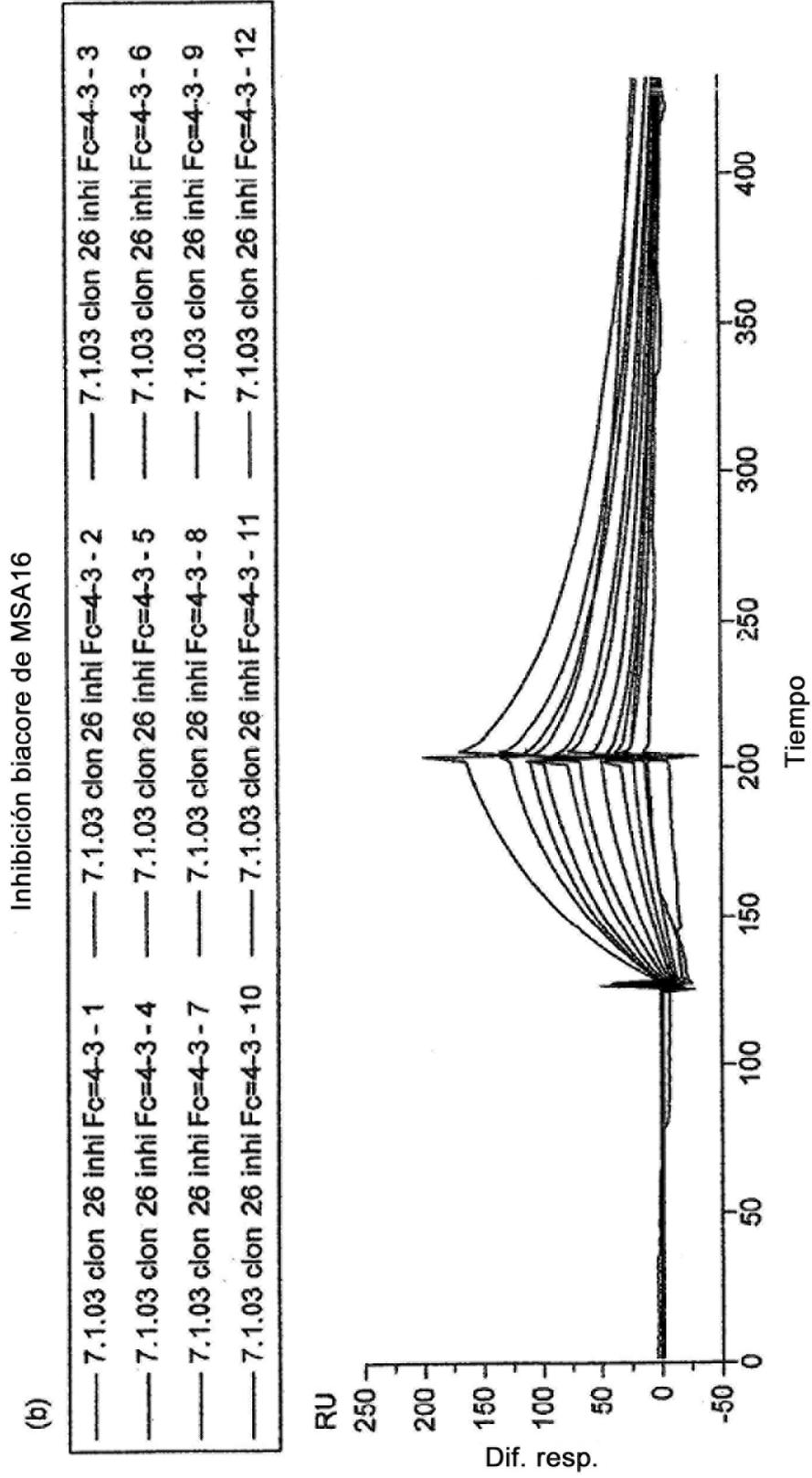


FIG. 18

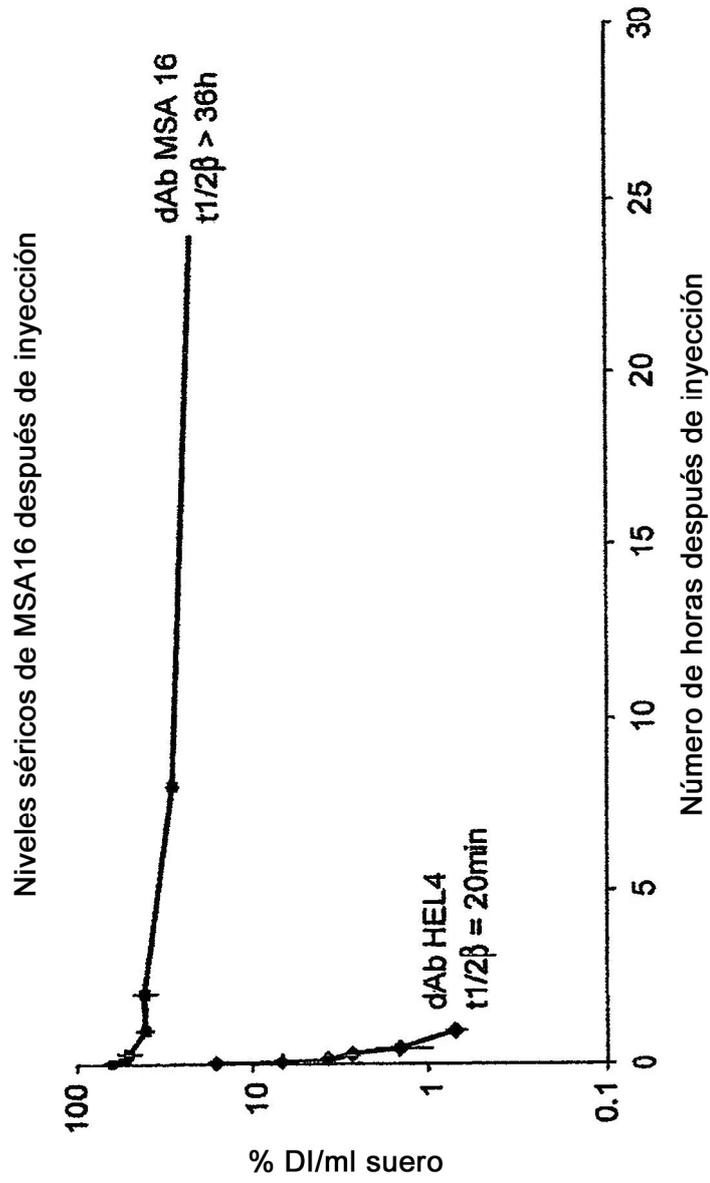


FIG. 19

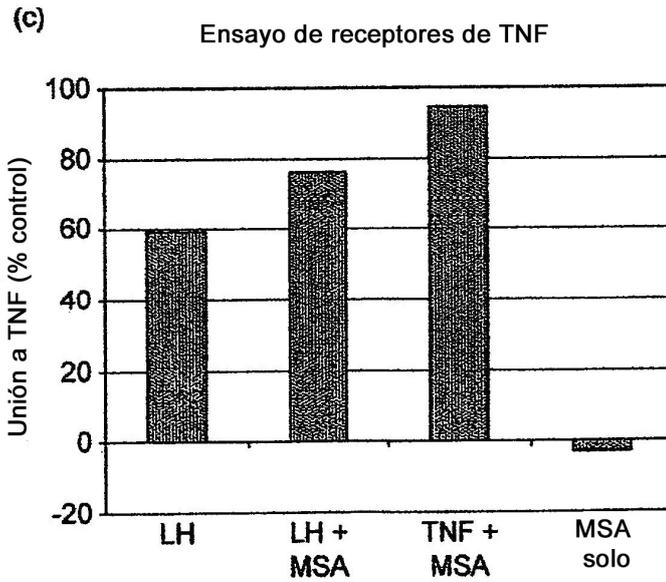
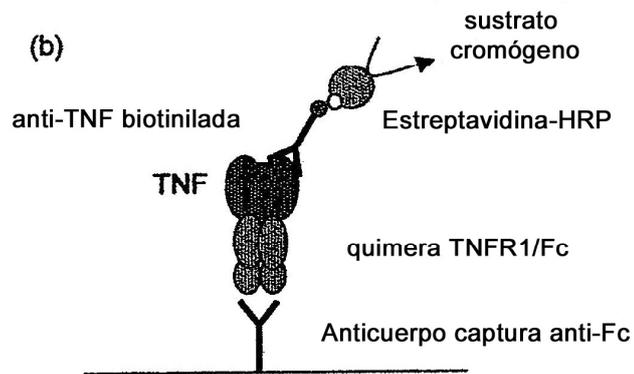
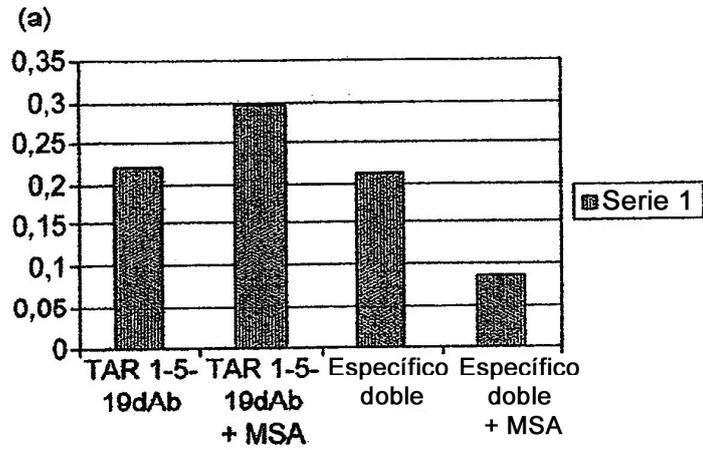
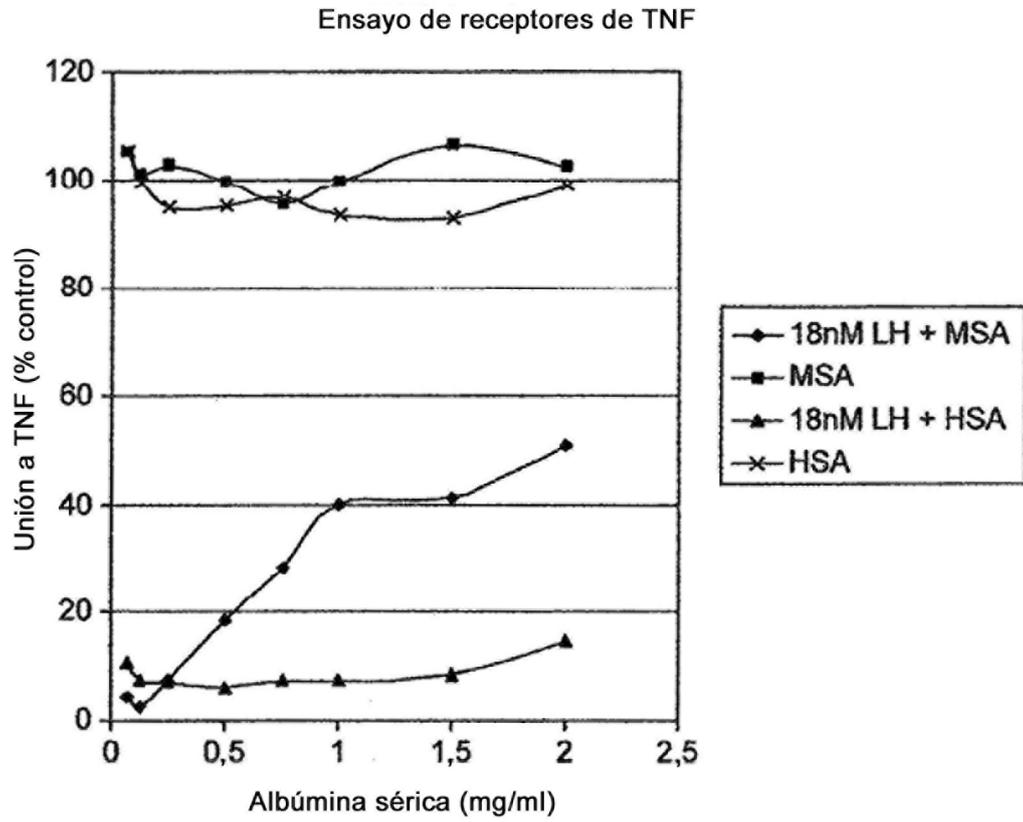
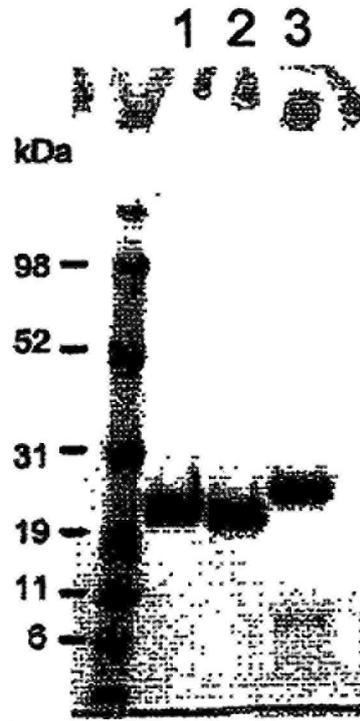
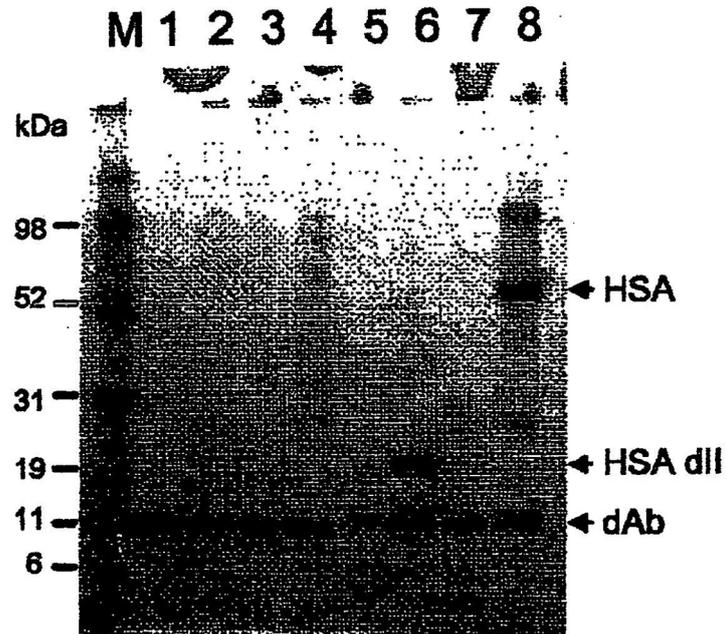


FIG. 20





**Figura 21.** Dominios recombinantes purificados de albúmina sérica humana (HSA), pistas 1-3 contienen dominios I, II y III de HSA, respectivamente.



**Figura 22.** Ejemplo de una inmunoprecipitación que indica que un dAb de unión a HSA se une a HSA de longitud completa (pista 8) y al dominio II de HSA (pista 6), pero no se une a los dominios I y III de HSA (pistas 5 y 7). Un dAb de no unión a HSA no rebaja HSA de longitud completa o dominios HSA I, II o III (pistas 1-4).

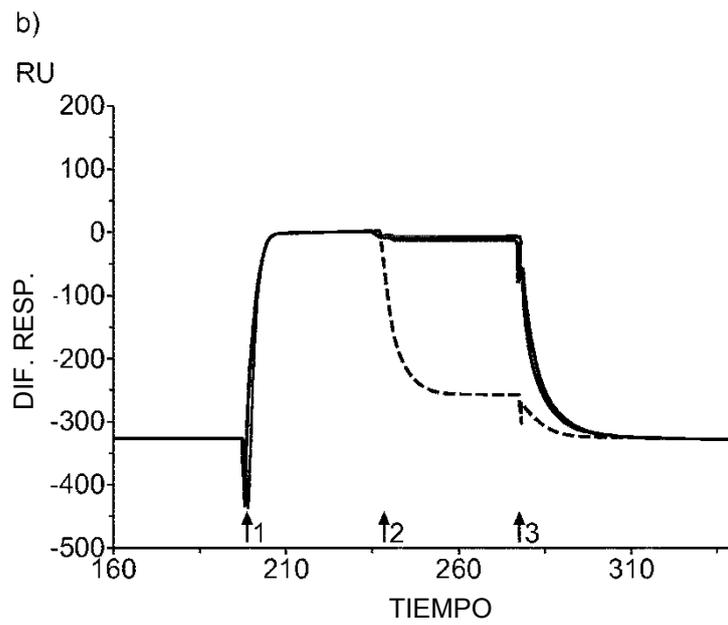
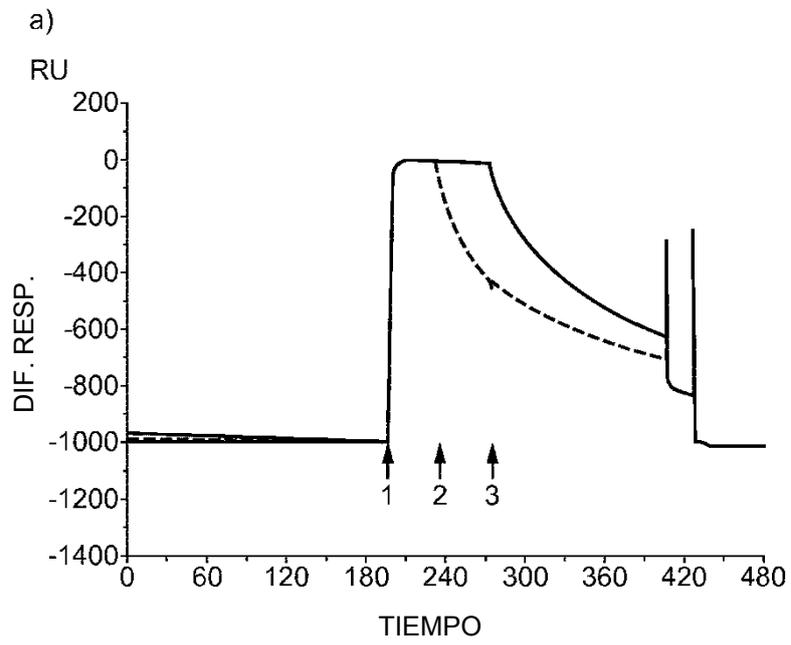


FIG. 23





```

              7                               56
HSAD1 (7) DAHKS----EVAHRFKDLGHEENFKALVLIIFAQYLQCCPFEDHVKLVNEV
HSAD2 (7) GKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
HSAD3 (7) VEEPQNLIKQNCLELFEQLGGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNL
Consenso (7) S K C F IGE FKA LLIRFSQKLPQ F DLVKLV DL
              57                               106
HSAD1 (53) TEFAKTCVAD--ESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQK
HSAD2 (57) TKVHTCCCHG---DLLECADDRADLAK--Y-ICENQDSISSKLECCCKP
HSAD3 (57) GKVGSKCKKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES
Consenso (57) TKVAS CC L CADD SL LCIL IS KL DCC K
              107                               156
HSAD1 (101) EPERNECFLOHKDDNENLPRRLVRPEVDVM---CTAFHDNEETFLKKYLY
HSAD2 (101) LLEKSHCTAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
HSAD3 (107) LVNRRPCFSALEVDETYVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV
Consenso (107) LLER CFA LE DE LPK AE FV DICT F D KDIFL FLY
              157                               206
HSAD1 (147) EIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGK
HSAD2 (151) EYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFPKPLVE
HSAD3 (157) ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEAEGKKLVAASQ
Consenso (157) EIARRHP FS LL LAK Y A LERCC AADK CFA DELK
              207
HSAD1 (197) ASSAKQR
HSAD2 (201) EP-----
HSAD3 (207) AALG---
Consenso (207) AA A

```

Figura 25. Alineamientos de los tres dominios de albúmina sérica humana. Se puede ver claramente la conservación de los restos de cisteína.