

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 098**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012 PCT/EP2012/072335**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068571**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12801467 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2776466**

54 Título: **Anticuerpos de unión a albumina y fragmentos de unión de los mismos**

30 Prioridad:

11.11.2011 US 201161558559 P

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

10.01.2018

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**ADAMS, RALPH;
BHATTA, PALLAVI;
HEYWOOD, SAM PHILIP y
HUMPHREYS, DAVID PAUL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 098 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

Anticuerpos de unión a albumina y fragmentos de unión de los mismos

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos de unión a albúmina y a fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para extender la vida media en suero *in vivo* de fármacos o proteínas conjugados a los mismos. También se proporcionan métodos para la producción de tales moléculas y composiciones farmacéuticas que los comprenden.

La alta especificidad y afinidad de los anticuerpos los convierte en ideales agentes de diagnósticos y terapéuticos, particularmente para modular las interacciones proteína:proteína. Los avances en el campo de la tecnología de anticuerpos recombinantes han dado como resultado la producción de fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂ y otros fragmentos de anticuerpos. Estas moléculas más pequeñas retienen la actividad de unión a antígeno de anticuerpos completos y también pueden exhibir una mejor penetración de tejido y propiedades farmacocinéticas en comparación con moléculas de inmunoglobulina completas. De hecho, los fragmentos de anticuerpos están demostrando ser agentes terapéuticos versátiles, como lo demuestra el reciente éxito de productos como ReoPro® y Lucentis®. Mientras que tales fragmentos parecen exhibir una serie de ventajas sobre las inmunoglobulinas completas, también sufren una mayor tasa de eliminación del suero ya que carecen del dominio Fc que imparte una larga vida *in vivo* (Medasan et al., 1997, J. Immunol. 158: 2211 - 2217).

Se conocen medios para mejorar la vida media de los fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ y otros fragmentos de anticuerpos. Un enfoque ha sido conjugar el fragmento a moléculas de polímero. Por lo tanto, la vida media circulante corta de los fragmentos Fab', F(ab')₂ en animales se ha mejorado por conjugación con polietilenglicol (PEG, ver, por ejemplo, WO98/25791, WO99/64460 y WO98/37200). Otro enfoque ha sido modificar el fragmento de anticuerpo por conjugación con un agente que interacciona con el receptor FcRn (véase, por ejemplo, WO97/34631). Incluso otro enfoque más para extender la vida media ha sido usar polipéptidos que se unen a la albúmina sérica (véase, por ejemplo, Smith et al., 2001, Bioconjugate Chem. 12: 750-756; EP0486525; US6267964; WO04/001064; WO02/076489; y WO01/45746). La albúmina sérica es una proteína abundante en compartimentos tanto vasculares como extravasculares con una vida media en el hombre de aproximadamente 19 días (Peters, 1985, Adv Protein Chem. 37: 161-245). Esto es similar a la vida media de IgG1, que es de aproximadamente 21 días (Waldeman & Strober, 1969, Progr. Allergy, 13: 1-110).

Se han descrito dominios variables simples de unión a albúmina sérica junto con su uso como conjugados para aumentar la vida media de fármacos, que incluyen fármacos, proteínas y péptidos NCE (entidad química), véase, por ejemplo, Holt et al. Protein Engineering, Design & Selection (Ingeniería, Diseño y Selección de Proteínas), vol. 21, 5, pp 283-288, WO04003019, WO2008/096158, WO05118642, WO2006/0591056 y WO2011/006915. Se han descrito otros anticuerpos anti-albúmina sérica y su uso en formatos de anticuerpos multiespecíficos en WO2009/040562, WO2010/035012 y WO2011/086091. En particular, ya se han descrito dos dominios variables conocidos como 645gH1 y 645gL1 que tienen las secuencias dadas en este documento en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. El documento WO2011/036460 describe el desarrollo de nuevos formatos de anticuerpos multivalentes; algunos de los cuales utilizan los dominios variables anti-albúmina humanizados 645gH1 y 645gL1.

La presente invención proporciona anticuerpos de unión a albúmina mejorados derivados de esas secuencias. Ventajosamente, los anticuerpos de la presente invención tienen una afinidad comparable al anticuerpo de partida y además pueden tener una o más propiedades que los hacen adecuados para uso en un producto terapéutico, por ejemplo, inmunogenicidad reducida, estabilidad aumentada, expresiones mejoradas o similares.

Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se unen a la albúmina de suero humano.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención se unen a albúmina de suero de cynomolgus, albúmina de suero murino y/o albúmina de suero de rata.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de unión a albúmina o un fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de unión a albúmina o un fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de unión a albúmina o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

En una realización, la región variable de la cadena pesada tiene una cisteína en la posición 44 de la cadena pesada y tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la región variable de la cadena ligera tiene una cisteína en la posición 100 de la cadena ligera y tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4.

Las regiones variables de anticuerpo de la presente invención se pueden incorporar a cualquier formato de anticuerpo adecuado. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos completos y fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos. Por consiguiente, tales anticuerpos de unión a albúmina pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de la misma y pueden ser, pero sin estar limitado a, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio variable único, scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, tricuerpos, DVD-Ig, DART, BiTE y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2 (3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/22853, WO 99/37791 y WO05/113605). Otros formatos multivalentes/multiespecíficos incluyen los descritos en los documentos WO2009/040562, WO2010/035012 y WO2011/086091 que incluyen Fab-Fv y Fab-dsFv ilustrados en la presente en las Figuras 1A y 1B, respectivamente.

Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, se pueden seleccionar teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que pueden requerirse. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En particular, pueden usarse dominios de la región constante IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando se requieren las funciones efectoras del anticuerpo. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando no se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Se apreciará que también pueden usarse variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, pueden usarse moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. Los expertos en la técnica también entenderán que los anticuerpos pueden experimentar una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones a menudo depende de la línea celular del huésped utilizada para expresar el anticuerpo, así como las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glucosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi- terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ, Journal of Chromatography 705: 129-134, 1995).

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

Se apreciará que tales anticuerpos que se unen a albúmina o fragmentos de los mismos, pueden conjugarse con cualquier otro anticuerpo o fragmento del mismo, otras proteínas tales como enzimas, hormonas, citocinas, péptidos u otras moléculas o fármacos, según se desee. Los anticuerpos de unión a albúmina de la presente invención son particularmente útiles para extender la vida media en suero de tales entidades conjugadas a los mismos.

En un ejemplo, el anticuerpo de unión a albúmina de la presente invención está unido, covalentemente o no covalentemente, a un compuesto terapéutico o de diagnóstico seleccionado. Los compuestos terapéuticos adecuados pueden incluir, por ejemplo, agonistas o antagonistas de receptores, inhibidores de enzimas, quelantes de metales, agentes antivirales, agentes antifúngicos, fármacos cardiovasculares y fármacos quimioterapéuticos.

En una realización, un anticuerpo de unión a albúmina o fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención se fusiona o conjuga con un segundo anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno de interés.

En una realización, un antígeno de interés unido por el segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser una proteína celular asociada, por ejemplo, una proteína de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante tal como aquellas proteínas reguladas positivamente durante la enfermedad o infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos particulares de proteínas de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como integrinas β 1, VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD 134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CD27L, CD27L, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nectin-like2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos del MHC Clase I y MHC de Clase II, y VEGF, y cuando corresponda, receptores de los mismos.

Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, virus antígenos, por ejemplo, virus sincitial respiratorio o antígenos de citomegalovirus, inmunoglobulinas, como IgE, interferones como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y, cuando proceda, receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos

bacterianos de superficie celular, toxinas bacterianas, virus tales como influenza, EBV, HepA, B y C, agentes de bioterrorismo, radionucleidos y metales pesados, y venenos de serpiente y araña y toxinas.

5 En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo puede usarse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.

10 El anticuerpo o fragmento del mismo conjugado con el anticuerpo de unión a albúmina de la presente invención puede ser de cualquier especie, pero preferiblemente se deriva de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo completamente humano o un anticuerpo humanizado. Un fragmento de anticuerpo para su uso en la presente invención puede derivarse de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o una subclase de molécula de inmunoglobulina y puede obtenerse de cualquier especie que incluya, por ejemplo, ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o humano.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab o Fab' que es un fragmento de anticuerpo monoclonal, completamente humano, humanizado o quimérico. En una realización, los fragmentos Fab o Fab' del anticuerpo son completamente humanos o humanizados.

15 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, Nature, 1975, 256, 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., Immunology Today, 1983, 4, 72) y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

20 Los anticuerpos para uso en la invención también se pueden generar usando métodos de anticuerpo de linfocito único clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 (15), 7843 - 7848, WO 92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.

25 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5,585,089).

30 Los anticuerpos para uso en la presente invención también se pueden generar usando diversos métodos de expresión en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 1995, 182, 41 - 50; Ames et al., J. Immunol. Methods, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. EUR. J. Immunol., 1994, 24, 952 - 958; Persic et al., Gene, 1997 187, 9-18; y Burton et al., Advances in Immunology, 1994, 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; y 5,969,108. Además, los ratones transgénicos u otros organismos, incluidos otros mamíferos, pueden usarse para generar anticuerpos humanizados.

35 Los anticuerpos completamente humanos son aquellos en los que las regiones variables y las regiones constantes (donde están presentes) tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, por los métodos de expresión en fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la región constante y/o variable de la inmunoglobulina murina han sido reemplazados por sus homólogos humanos, por ejemplo, como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 B1, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,661,016, US5,770,429, EP 0438474 B1 y EP0463151 B1.

45 El fragmento de anticuerpo, por ejemplo, Fab o Fab', material de partida para uso en la presente invención puede obtenerse a partir de cualquier anticuerpo completo, especialmente un anticuerpo monoclonal completo, usando cualquier técnica de escisión y/o digestión enzimática adecuada, por ejemplo, mediante tratamiento con pepsina. Alternativamente, además, el material de partida del anticuerpo puede repararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y la re-expresión del ADN que codifica regiones variables y/o constantes de anticuerpos. Las técnicas estándar de biología molecular se pueden usar para modificar, agregar o eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Cualquier alteración de las regiones variables o constantes todavía están abarcadas por los términos regiones "variable" y "constante" como se usan en este documento.

55 El material de partida del fragmento de anticuerpo se puede obtener a partir de cualquier especie que incluye, por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Las partes del fragmento de anticuerpo se pueden obtener de más de una especie, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El material de partida del fragmento de anticuerpo también puede modificarse. En otro ejemplo, la región variable del fragmento de anticuerpo se ha creado usando técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Dichas versiones modificadas incluyen las creadas, por ejemplo, a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, deleciones o cambios en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Los ejemplos particulares de este tipo

5 incluyen aquellos dominios de región variable diseñados que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos estructurales de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo. Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Boss et al., US 4,816,397; Cabilly et al., US 6,331,415, Shrader et al., WO 92/02551; Ward et al., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86,3833; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; Bird et al., 1988, Science, 242, 423; Queen et al., US 5,585,089, Adair, WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10, 1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

10 En un ejemplo, un dominio variable de unión a albúmina de la presente invención se fusiona con un anticuerpo de dominio único o dAb. Los dominios variables únicos también conocidos como anticuerpos de dominio único o dAbs para uso en la presente invención se pueden generar usando métodos conocidos en la técnica e incluyen los descritos en WO2005118642, Ward et al., 1989, Nature, 341, 544-546 y Holt et al., 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490. En una realización, un anticuerpo de dominio único para uso en la presente invención es un dominio variable de cadena pesada (VH) o un dominio de cadena ligera (VL). Cada dominio de cadena ligera puede ser del subgrupo kappa o lambda. Los métodos para aislar dominios VH y VL se han descrito en la técnica, ver por ejemplo EP0368684 y Ward et al., *supra*. Dichos dominios pueden derivarse de cualquier especie adecuada o material de partida del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo de dominio único puede derivar de un roedor, un ser humano u otra especie. En una realización, el anticuerpo de dominio único se humaniza.

20 En una realización, el anticuerpo de dominio único se deriva de una biblioteca de expresión en fago, usando los métodos descritos en, por ejemplo, WO2005/118642, Jespers et al., 2004, Nature Biotechnology, 22, 1161-1165 y Holt et al., 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490. Preferiblemente, dichos anticuerpos de dominio único son completamente humanos, pero también pueden derivarse de otras especies. En una realización, el dominio variable único es quimérico porque el marco es de origen humano o sustancialmente humano y la(s) CDR(s) es(son) de origen no humano. Se apreciará que la secuencia del anticuerpo de dominio único una vez aislado puede modificarse para mejorar las características del anticuerpo de dominio único, por ejemplo, la solubilidad, como se describe en Holt et al., *supra*.

25 Sustancialmente humano, tal como se emplea en la presente, pretende referirse a que se conserva el carácter humano del material original, que puede ser relevante para la inmunogenicidad. Material sustancialmente humano incluiría en el que un aminoácido en la secuencia marco se agrega elimina o reemplaza por otro aminoácido.

30 En una realización, el dAb es una secuencia humana obtenida a partir de expresión en fagos scFv o de un Humouse™ transgénico o Velocimouse™ o un roedor humanizado.

35 En una realización, el dAb se obtiene de un roedor humano o humanizado, un camélido o un tiburón. Tal dAb preferiblemente se humanizará. En un ejemplo, el anticuerpo de dominio único es un dominio VHH basado en inmunoglobulinas de camélido como se describe en el documento EP0656946. En un ejemplo, un camello o una llama se inmuniza con un antígeno de interés y se recoge sangre cuando el título es apropiado. El gen que codifica el dAb se puede clonar mediante PCR de célula única, o la(s) célula(s) B que codifica el dAb se puede inmortalizar mediante transformación con VEB, o mediante fusión a una línea celular inmortal.

40 En un ejemplo, uno o más de los dominios variables de anticuerpo de la presente invención se incorporan en un formato de anticuerpo multivalente como se describe en los documentos WO2009/040562, WO2010/035012 o WO2011/086091. Dichos formatos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o triespecíficos. Por tanto, en una realización preferida, las proteínas de fusión de anticuerpo de la invención son proteínas de fusión de traslación, es decir, fusiones genéticas, cuya secuencia está codificada por un vector de expresión. Alternativamente, los componentes de la proteína de fusión del anticuerpo se pueden fusionar usando medios químicos, es decir, mediante conjugación química o reticulación química. Dichos medios químicos son conocidos en la técnica.

45 Ejemplos de tales proteínas de fusión de traducción, con y sin enlaces disulfuro se ilustran en la Figura 1A y 1B.

Por consiguiente, en una realización se proporciona una proteína de fusión de anticuerpos multiespecífica que comprende un fragmento de Fab o Fab' de anticuerpo con especificidad para un antígeno de interés, fusionándose dicho fragmento con al menos una única secuencia de dominio variable que tiene especificidad por albúmina sérica humana que tiene la SEQ dada en la SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

50 En un ejemplo, los dominios variables de anticuerpos que se unen a albúmina de la presente invención se fusionan a fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o modificada. Cuando el fragmento de anticuerpo para uso en la preparación de dicha proteína de fusión de la invención es un fragmento Fab', dicho fragmento generalmente se extiende en el extremo C de la cadena pesada por uno o más aminoácidos. De este modo, una fusión de anticuerpos de la invención puede comprender una traducción del fragmento Fab' fusionada (o fusionada químicamente) a una región variable de unión a la albúmina, directamente o a través de un enlazador. Además, los ejemplos de fragmentos de Fab' de anticuerpo adecuados incluyen los descritos en los documentos WO2005003170 y WO2005003171.

En otro ejemplo, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos Fab. Por lo tanto, una fusión de anticuerpo de la

invención puede comprender una traducción de fragmento Fab fusionada (o fusionada químicamente) a una secuencia enlazadora que a su vez está fusionada por traducción (o fusionada químicamente) a una o más regiones variables de unión a albúmina. Preferiblemente, el fragmento Fab es un fragmento Fab que termina en las cisteínas intercadenas, como se describe en el documento WO2005/003169.

- 5 En la presente invención, cada dominio variable anti-albúmina fusionado a un fragmento Fab o Fab' puede enlazarse directamente o a través de un enlazador.

Ligado directamente como se emplea en este documento, pretende hacer referencia al hecho que el "último" aminoácido del Fab o Fab' está unido por un enlace peptídico al "primer" aminoácido del dominio variable único de un anticuerpo de unión a albúmina de la presente invención (o viceversa).

- 10 Los ejemplos de regiones enlazadoras adecuadas para unir un dominio variable a un Fab o Fab' incluyen, pero no se limitan a, secuencias enlazadoras flexibles y secuencias enlazadoras rígidas. Las secuencias enlazadoras flexibles incluyen las descritas en Huston et al., 1988, PNAS 85: 5879-5883; Wright y Deonarain, Mol. Immunol., 2007, 44 (11): 2860 - 2869; Alfthan et al. Prot. Eng., 1995, 8 (7): 725 - 731; Luo et al., J. Biochem., 1995, 118 (4): 825 - 831; Tang et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 (26): 15682 - 15686; y Turner et al., 1997, JIMM 205, 42-54 (ver Tabla 1 para ejemplos representativos).
- 15

Tabla 1. Secuencias de enlazador flexible

| SEQ. ID N°: | SECUENCIA |
|-------------|---|
| 21 | SGGGGSE |
| 22 | DKTHTS |
| 23 | (S)GGGGS |
| 24 | (S)GGGGSGGGGS |
| 25 | (S)GGGGSGGGGS |
| 26 | (S)GGGGSGGGGS |
| 27 | (S)GGGGSGGGGS |
| 28 | AAAGSG-GASAS |
| 29 | AAAGSG-XGGGS-GASAS |
| 30 | AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS |
| 31 | AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS |
| 32 | AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS |
| 33 | AAAGSG-XS-GASAS |
| 34 | PGGNRGT T T T T R R P A T T T G S S P G P T Q S H Y |
| 35 | AT T T G S S P G P T |
| 36 | AT T T G S |
| - | GS |
| 37 | EP S G P I S T I N S P P S K E S H K S P |
| 38 | G T V A A P S V F I F P P S D |
| 39 | G G G G I A P S M V G G G G S |
| 40 | G G G G K V E G A G G G G G S |
| 41 | G G G G S M K S H D G G G G S |
| 42 | G G G G N L I T I V G G G G S |

ES 2 649 098 T3

| | |
|---|---------------------|
| 43 | GGGGVPSLPGGGS |
| 44 | GGEKSIPGGGS |
| 45 | RPLSYRPPFPFGFPSVRP |
| 46 | YPRSIYIRRRHPSPLTT |
| 47 | TPSHLSHILPSFGLPTFN |
| 48 | RPVSPFTFPRLSNSWLPA |
| 49 | SPA AHFPRSIPRPGPIRT |
| 50 | APGPSAPSHRSLPSRAFG |
| 51 | PRNSIHFLHPLLVA PLGA |
| 52 | MPSLSGVLQVRYLSPDDL |
| 53 | SPQYPSPLTLTLPPHPSL |
| 54 | NPSLNPPSYLHRAPSRIS |
| 55 | LPWRTSLLPSLPLRRRP |
| 56 | PPLFAKGPVGLLSRSFPP |
| 57 | VPPAPVVSLSRSAHARPPY |
| 58 | LRPTPPRVRSYTCCPTP- |
| 59 | PNVAHVLP LLTVPWDNLR |
| 60 | CNPLLPLCARSPAVRTFP |
| (S) es opcional en las secuencias 23 a 27 | |

Los ejemplos de enlazadores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 61), PPPP (SEQ ID NO: 62) y PPP.

5 En una realización, se usa una secuencia de la región bisagra de anticuerpo o parte de la misma como un enlazador, por ejemplo, la secuencia bisagra superior. Típicamente, los fragmentos Fab' de anticuerpo para uso en la presente invención poseen una región bisagra nativa o modificada. Dichas regiones bisagra se usan como un enlazador natural para el resto del dominio variable de unión a albúmina. La región bisagra nativa es la región bisagra normalmente asociada con el dominio C_H1 de la molécula de anticuerpo. Una región bisagra modificada es cualquier bisagra que difiere en longitud y/o composición de la región bisagra nativa. Dichas bisagras pueden incluir regiones articuladas de cualquier otra especie, tales como regiones bisagra humanas, de ratón, de rata, de conejo, de hámster, de camello, de llama o de cabra. Otras regiones bisagra modificadas pueden comprender una región bisagra completa derivada de un anticuerpo de una clase o subclase diferente de la del dominio C_H1. Por lo tanto, por ejemplo, un dominio de C_H1 de clase γ 1 se puede unir a una región bisagra de clase γ 4. Alternativamente, la región bisagra modificada puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad repetitiva en la que cada unidad en la repetición se deriva de una región bisagra natural. En una alternativa adicional, la región bisagra natural se puede alterar convirtiendo uno o más residuos de cisteína u otros en residuos neutros, tales como alanina, o convirtiendo restos colocados adecuadamente en residuos de cisteína. De este modo, el número de residuos de cisteína en la región bisagra puede aumentarse o reducirse. Además, se pueden controlar otras características de la bisagra, como la distancia de la(s) cisteína(s) de bisagra de la cadena ligera a la cisteína intercadena, la distancia entre las cisteínas de la bisagra y la composición de otros aminoácidos en la bisagra que pueden afectar propiedades de la bisagra como la flexibilidad, por ejemplo, las glicinas pueden incorporarse en la bisagra para aumentar la flexibilidad de rotación o pueden incorporarse prolinas para reducir la flexibilidad. Alternativamente, se pueden incorporar combinaciones de residuos cargados o hidrófobos en la bisagra para conferir propiedades de multimerización, véase, por ejemplo, Richter et al., 2001, Prot. Eng. 14 (10): 775-783 para el uso de colas cargadas o iónicas, por ejemplo, colas ácidas como enlazadores y Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 5 (1): 1547-1553 para secuencias de cremallera de leucina. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser completamente sintéticas y pueden diseñarse para que posean propiedades deseadas tales como longitud, composición y flexibilidad.

Se han descrito ya varias regiones de bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5,677,425, US

6,642,356, WO9915549, WO2005003170, WO2005003169, WO2005003170, WO9825971 y WO2005003171. Dichas bisagras generalmente siguen desde la región CH1, pero también pueden incorporarse en el extremo de la región constante de un fragmento kappa o lambda de cadena ligera; ver la Tabla 3 para ejemplos.

Tabla 3. Secuencias de enlazador de bisagra

| SEQ ID NO: | SECUENCIA |
|------------|---------------------------------|
| 63 | DKTHTCAA |
| 64 | DKTHTCPPCPA |
| 65 | DKTHTCPPCPATCPPCPA |
| 66 | DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA |
| 67 | DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY |
| 68 | DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY |
| 69 | DKTHTCCVECPCPA |
| 70 | DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA |
| 71 | DKTHTCPSCPA |

5

Los dominios variables de anticuerpos de la presente invención son un par complementario VH/VL que se unen al antígeno cooperativamente, es decir, son un par complementario VH/VL que tienen la misma especificidad de unión. De hecho, son un par VH/VL derivado del mismo anticuerpo.

10 En una realización, el dominio VH se fusiona con el extremo C de la región constante de la cadena pesada (CH1) y el dominio VL se fusiona con el extremo C de la región constante de la cadena ligera (C kappa o C lambda).

En una realización, VH y VL están unidos por un enlace disulfuro que se cree que proporciona estabilización adicional a la construcción, lo que puede ser ventajoso.

15 En una o más realizaciones, el enlace disulfuro entre las regiones constantes de la cadena pesada y ligera, por ejemplo, en un Fab, tal como entre el dominio CH y el dominio CL o CK no está presente, por ejemplo, porque una o más cisteínas que forman el enlace se reemplazan. Dicha una o más cisteínas pueden reemplazarse, por ejemplo, con serina.

En una o más realizaciones, está presente un enlace disulfuro intercadena entre las cadenas pesada y ligera entre el dominio CH y el dominio CL o CK.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífica que comprende:

20 una cadena pesada que comprende, en secuencia del N-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (V_{H1}), un dominio C_{H1} y un segundo dominio variable de cadena pesada (V_{H2}),

una cadena ligera que comprende, en secuencia del N-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (V_{L1}), un dominio CL y un segundo dominio variable de cadena ligera (V_{L2}),

25 donde dichas cadenas pesada y ligera están alineadas de modo que V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno y V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno,

donde el antígeno unido por el segundo sitio de unión a antígeno es albúmina de suero humano y en el segundo dominio variable de cadena pesada (V_{H2}) tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:1 y el segundo dominio variable de cadena ligera (V_{L2}) tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3.

30 En una realización, las regiones variables de cadena pesada y ligera de unión a albúmina están unidas mediante un enlace disulfuro. Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención proporciona una proteína de fusión de anticuerpo biespecífica que comprende:

una cadena pesada que comprende, en secuencia del N-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (V_{H1}), un dominio C_{H1} y un segundo dominio variable de cadena pesada (V_{H2}),

35 una cadena ligera que comprende, en secuencia del N-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (V_{L1}), un dominio CL y un segundo dominio variable de cadena ligera (V_{L2}),

donde dichas cadenas pesada y ligera están alineadas de manera que VH1 y VL1 forman un primer sitio de unión a antígeno y VH2 y VL2 forman un segundo sitio de unión a antígeno,

donde el antígeno unido por el segundo sitio de unión a antígeno es albúmina de suero humano,

5 donde el segundo dominio variable de cadena pesada (V_{H2}) tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y el segundo dominio variable de cadena ligera (V_{L2}) tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 4 y

el segundo dominio variable de cadena pesada (V_{H2}) y el segundo dominio variable de cadena ligera (V_{L2}) están unidos por un enlace disulfuro.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una proteína de fusión de anticuerpos multiespecífica que comprende:

10 una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el N-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (V_{H1}), un dominio CH1, un segundo dominio variable de cadena pesada (V_{H2}) y un tercer dominio variable de cadena pesada (V_{H3}),

15 una cadena ligera que comprende, en secuencia del N-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (V_{L1}), un dominio CL, un segundo dominio variable de cadena ligera (V_{L2}) y un tercer dominio variable de cadena ligera (V_{L3}),

donde dichas cadenas pesada y ligera están alineadas de manera que VH1 y VL1 forman un primer sitio de unión a antígeno y VH2 y VL2 forman un segundo sitio de unión a antígeno y VH3 y VL3 forman un tercer sitio de unión a antígeno,

20 donde el antígeno unido por el segundo o tercer sitio de unión a antígeno es albúmina de suero humano y donde el segundo o tercer dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y el segundo o tercer dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

25 Se apreciará que puede haber enlazadores entre uno o más de los dominios enumerados anteriormente. En particular, puede haber un enlazador entre CL y VL2 y CH1 y VH2 y, cuando está presente, un enlazador entre VL2 y VL3 y VH2 y VH3. Los enlazadores adecuados ya se han descrito anteriormente en la presente. En la figura 2 (e) y (f), SEQ ID NOs 5 y 6, se proporcionan enlazadores adicionales.

En una realización, el anticuerpo es un scFv. En una realización, el anticuerpo es un scFv en el que los dominios variables (VH y VL) están unidos por el enlazador proporcionado en SEQ ID NO: 17.

30 Los dominios variables de anticuerpos de la presente invención se unen a albúmina con una afinidad de unión suficiente para extender la vida media del conjugado, tal como Fab o Fab' *in vivo*. Se ha informado que una afinidad para la albúmina menor o igual a afinidad de 2.5 μ M extenderá la vida media *in vivo* (Nguyen, A. et al (2006) Protein Engineering, Design & Selection, 19 (7), 291-297). En un ejemplo, el par de anticuerpos de dominio variable de la presente invención tiene una alta afinidad de unión, por ejemplo, 3 nM nanomolar. En un ejemplo, los anticuerpos de dominio único tienen una afinidad de unión por antígeno que es nanomolar o micromolar. La afinidad puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye resonancia plasmónica de superficie usando albúmina de suero natural o recombinante.

35 Preferiblemente, el anticuerpo de unión a albúmina de la presente invención tiene una afinidad de unión por albúmina de suero humano de aproximadamente 1 μ M o mejor. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 500 M o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 200 nM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 nM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 nM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 20 nM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 5 nM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 2 nM o menos. En una realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión de aproximadamente 1 nM o menos. Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La presente invención, por lo tanto, también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por la albúmina. Dichas variantes se pueden obtener mediante varios protocolos de maduración de afinidad que incluyen mutar las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), intercambio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), mezcla de ADN (Patten et al., Curr. Opin Biotechnol., 8, 724 - 733, 1997), expresión en fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77 - 88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., Nature, 391, 288 - 291, 1998). Vaughan et al. (*supra*) discute estos métodos de maduración de afinidad.

55 La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica un anticuerpo de unión a

albúmina o proteína de fusión de la presente invención. Las secuencias de ADN de la presente invención pueden comprender ADN sintético, por ejemplo, producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

5 Las secuencias de ADN que codifican las proteínas de fusión de anticuerpo de doble especificidad de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de los fragmentos de anticuerpo, enlazadores y/o dAbs pueden sintetizarse según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

10 Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpo de doble especificidad de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. La mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden usar según corresponda.

15 La presente invención se refiere además a un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpo de doble especificidad de la presente invención. En una realización preferida, el vector de clonación o expresión comprende una única secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de anticuerpo de doble especificidad completa. Por lo tanto, el vector de clonación o expresión comprende unidades de transcripción codificadas por ADN en secuencia de manera que se produce una proteína de fusión de traducción.

20 De hecho, los expertos en la técnica entenderán que una proteína de fusión de la invención puede tener el dominio variable de unión a la albúmina en el extremo N o el extremo C y, por lo tanto, la unidad de transcripción codificada de ADN de unión a la albúmina será el primero o el último, respectivamente, dentro de la secuencia de ADN que codifica la fusión de traducción. Por lo tanto, una fusión de traducción puede comprender un dominio variable N-terminal y un Fab o Fab' C-terminal. Además, una fusión de traducción puede comprender un Fab o Fab' N-terminal y un dominio variable de unión a albúmina C-terminal.

Se apreciará que la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de la misma se pueden incorporar en el mismo vector o vectores diferentes. En una realización, un vector puede comprender una fusión de traducción que comprende una cadena pesada y otro vector puede comprender una fusión de traducción que comprende una cadena ligera.

30 El código de ADN para un fragmento de anticuerpo comprendido dentro de una fusión de traducción de la invención puede incorporarse en un vector como unidad de transcripción en configuraciones conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, una unidad de transcripción puede comprender un código para la cadena ligera seguida por el código de cadena pesada, o viceversa; ver, en particular, Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26: 309-320.

35 Preferiblemente, un vector de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia líder apropiada, tal como una secuencia líder de anticuerpo. Dichas secuencias líder son bien conocidas en la técnica.

40 Los métodos generales por los que pueden construirse los vectores, los métodos de transfección y transformación y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

45 También se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican una proteína de fusión de anticuerpo de doble especificidad de la presente invención. Se puede usar cualquier sistema de célula huésped/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la proteína de fusión de anticuerpo de doble especificidad. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos o eucariotas, por ejemplo, mamíferos, también pueden usarse sistemas de expresión de células del huésped. Las células huésped adecuadas de mamífero incluyen células NS0, CHO, mieloma o hibridoma. Por consiguiente, en una realización, la proteína de fusión de la presente invención se expresa en *E. coli*. En otra realización, la proteína de fusión de la presente invención se expresa en células de mamífero.

50 La presente invención también proporciona un proceso para la producción de un anticuerpo de unión a albúmina o proteína de fusión que comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de proteína a partir de la secuencia de ADN que codifica dicho anticuerpo de unión a albúmina. La invención proporciona además métodos para aislar el anticuerpo de unión a albúmina.

55 En la producción, un anticuerpo de unión a albúmina de la presente invención se puede purificar, cuando sea necesario, usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, pero sin limitación, se pueden usar técnicas cromatográficas tales como intercambio iónico, exclusión de tamaño, proteína G o cromatografía de interacción hidrofóbica.

- El tamaño del anticuerpo o la proteína de fusión del anticuerpo pueden confirmarse por métodos convencionales conocidos en la técnica, tales como cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE no reductora. Tales técnicas pueden usarse, por ejemplo, para confirmar que la proteína no se ha dimerizado y/o no tiene una parte faltante. Si se detectan dímeros y se requiere un producto monomérico homogéneo, entonces la proteína de fusión del anticuerpo monomérico puede purificarse alejándose de la especie dimérica usando técnicas de cromatografía convencionales como se describió anteriormente. En la presente invención, las regiones variables mejoradas proporcionadas en las SEQ ID NOs 1 a 4 dan como resultado que se produzca más monómero.
- Los anticuerpos, conjugados y proteínas de fusión de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos inmunitarios, trastornos fibróticos y cánceres.
- El término “enfermedad inflamatoria” o “trastorno” y “enfermedad o trastorno inmune” incluye artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Still, enfermedad de Muckle Wells, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, SLE (lupus eritematoso sistémico), asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mellitus tipo I, trasplante y enfermedad de injerto contra huésped.
- El término “trastorno fibrótico” incluye fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerosis sistémica (o esclerodermia), fibrosis renal, nefropatía diabética, nefropatía IgA, hipertensión, enfermedad renal terminal, fibrosis peritoneal (diálisis peritoneal ambulatoria continua), cirrosis hepática, degeneración macular relacionada con la edad (ARMD), retinopatía, fibrosis cardíaca reactiva, cicatrización, queloides, quemaduras, úlceras en la piel, angioplastia, cirugía de derivación coronaria, artroplastia y cirugía de cataratas.
- El término “cáncer” incluye un nuevo crecimiento maligno que surge del epitelio, que se encuentra en la piel o, más comúnmente, en el revestimiento de órganos del cuerpo, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y diseminarse (metástasis) a órganos distantes, por ejemplo: al hueso, hígado, pulmón o cerebro.
- Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, fusión de anticuerpo o conjugado de la invención en asociación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. También se proporciona el uso de una proteína de fusión de anticuerpos de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Más preferiblemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio.
- Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden tomar una forma adecuada para administración oral, bucal, parenteral, subcutánea, nasal, tópica, oftálmica o rectal, o una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación.
- Cuando sea apropiado, por ejemplo, si el anticuerpo o anticuerpos de dominio único de la proteína de fusión del anticuerpo se unen a la albúmina, puede ser deseable formular previamente la proteína de fusión de doble especificidad con albúmina sérica humana o recombinante, usando cualquier método adecuado conocido en la técnica.
- Cuando la formulación farmacéutica es un líquido, por ejemplo, una solución o suspensión, entonces la formulación puede comprender además albúmina, por ejemplo, albúmina de suero humano, en particular albúmina recombinante tal como albúmina sérica humana recombinante. Las cantidades adecuadas pueden estar en el intervalo de menos del 2% p/p de la formulación total, en particular de menos de 1, 0.5, o 0.1% p/p. Esto puede ayudar a estabilizar el componente de anticuerpo en la formulación. La composición farmacéutica se puede liofilizar para su posterior reconstitución, con un solvente acuoso.
- En una realización, se proporciona un recipiente de dosis unitaria, tal como un vial, que comprende un “anticuerpo” liofilizado de acuerdo con la invención.
- Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Las tabletas pueden ser recubiertas mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos o conservantes. Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, agentes colorantes o agentes edulcorantes, según sea apropiado.
- Las preparaciones para administración oral pueden formularse de forma adecuada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

5 Los anticuerpos, fusión y/o conjugados de la invención se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas de vidrio o recipientes multidosis, por ejemplo, viales de vidrio. Las composiciones para inyección pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

10 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los anticuerpos de la invención también se pueden formular como una preparación de liberación lenta (*depot formulations*). Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación o por inyección intramuscular.

15 Para la administración nasal o la administración por inhalación, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol para envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, fluorotriclorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas o mezcla de gases adecuados.

Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

20 Para la administración tópica, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular convenientemente en una pomada adecuada que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, petróleo líquido, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular en una loción adecuada que contiene el
25 componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, alcohol bencilico, 2-octildodecanol y agua.

En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas que incluye la inhalación.

30 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Los polvos inhalables según la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente de las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

35 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio), carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se usan de manera adecuada mono- o disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, particularmente, pero no exclusivamente, en forma de sus hidratos.

40 Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo, de 0.1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de importancia primaria.

45 Los gases propelentes que pueden usarse para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes mencionados anteriormente pueden usarse solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propelentes particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados antes mencionados, son particularmente adecuados TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos.

50 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes tales como co-solventes, estabilizantes, agentes tensioactivos (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente según la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles según la invención contienen, por ejemplo, 0.002 a 5% en peso, 0.01 a 3% en peso, 0.015 a 2% en peso, 0.1 a 2% en peso, 0.5 a 2% en peso o 0.5 a 1% en peso del ingrediente activo.

Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante administración de una solución líquida o formulación de suspensión, por ejemplo, empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus (R) conectado a un compresor Pari Master (R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

5 Los formatos de anticuerpos de la invención se pueden administrar dispersados en un solvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, solución salina u otro solvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro y 0.45 mg a 0.55 mg de citrato sódico por 1 ml de agua para alcanzar un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, anticuerpo liofilizado.

10 Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (p. Ej., albúmina sérica), EDTA, cloruro sódico, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generalmente se proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

15 Esto puede incluir la producción y la esterilización por filtración del solvente/solución tamponada utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de solvente tamponado estéril y la dispensación de la formulación en receptáculos estériles por métodos familiares a los de habilidad ordinaria en la técnica.

20 La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción se puede proporcionar, por ejemplo, como unidades de dosis únicas (por ejemplo, recipientes de plástico sellados o viales) empaquetados en sobres de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de solvente/solución tampón.

25 Se cree que los formatos de anticuerpos de la presente descripción son adecuados para la administración por nebulización.

30 Para la administración oftálmica, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular convenientemente como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica ajustada al pH, con o sin un conservante tal como un agente bactericida o fungicida, por ejemplo, nitrato fenilmercúrico, cloruro de bencilalconio o acetato de clorhexidina. Alternativamente, para administración oftálmica, los compuestos pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

35 Para la administración rectal, los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden formular convenientemente como supositorios. Estos se pueden preparar mezclando el componente activo con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y se fundirá en el recto para liberar el componente activo. Dichos materiales incluyen, por ejemplo, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

40 La cantidad de un compuesto de la invención requerida para la profilaxis o el tratamiento de una afección particular variarán dependiendo del compuesto elegido y del estado del paciente a tratar. En general, sin embargo, las dosificaciones diarias pueden variar de alrededor de 10 ng/kg a 1000 mg/kg, típicamente de 100 ng/kg a 100 mg/kg, por ejemplo alrededor de 0.01 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal para administración oral o bucal, de alrededor de 10 ng/kg a 50 mg/kg de peso corporal para administración parenteral, y de alrededor de 0.05 mg a alrededor de 1000 mg, por ejemplo, de alrededor de 0.5 mg a alrededor de 1000 mg, para administración nasal o administración por inhalación o insuflación.

Las características preferidas de cada realización de la invención son como para cada una de las otras realizaciones *mutatis mutandis*.

45 Que comprende en el contexto de la presente memoria descriptiva debe significar que incluye.

Cuando se pueden combinar realizaciones técnicamente apropiadas de la invención.

Las realizaciones que se describen en el presente documento comprenden ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a realizaciones separadas que consisten o consisten esencialmente en dichas características/elementos.

50 La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no se deben interpretar de ninguna manera como limitativos del alcance de la presente invención.

Lista de Figuras:

- Figura 1A: Representación diagramática de un Fab-Fv
- Figura 1B: Representación diagramática de un Fab-dsFv
- Figuras 2 a 5: Secuencias de la presente invención
- 5 Figura 6: Muestra el enlace de AlexaFluor 488 marcado A26 Fab-dsFv con células T CD4⁺OX40⁺ humanas activadas
- Figura 7: Muestra µg/ml de constructos de anticuerpos producidos por expresión transitoria en células HEK293
- Figura 8: Muestra SDS-PAGE de Fab disulfuro estabilizado scFv.
- 10 Figura 9: Muestra datos tabulados relacionados con la afinidad de unión a la albúmina sérica humana de diversos constructos
- Figura 10: Muestra datos tabulados del antígeno Fab de unión de afinidad de diversos constructos
- Figura 11: Muestra µg/ml de constructos de anticuerpos producidos por expresión transitoria en células CHO
- Figura 12: Muestra el análisis SDS-PAGE de diversos constructos
- 15 Figura 13: Muestra datos de termoestabilidad para diversos constructos expresados en células CHO.

Manipulación de ADN y métodos generales

Se usaron cepas de *E. coli* competentes para transformación y cultivo de crecimiento de rutina. Las enzimas de restricción y modificación de ADN se obtuvieron de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Las preparaciones de plásmido se realizaron usando kits de purificación Maxi Plasmid (QIAGEN, catálogo N° 12165).

20 Las reacciones de secuenciación de ADN se realizaron usando el kit de secuenciación terminador ABI Prism Big Dye (catálogo N° 4304149) y se procesaron en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados utilizando el programa Sequencher (Genecodes). Los oligonucleótidos se obtuvieron de Sigma o Invitrogen. Los genes que codifican las secuencias de la región V inicial se construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizado por DNA2.0, y se modificaron para generar las versiones injertadas mediante mutagénesis

25 dirigida a oligonucleótidos. La concentración de Fab-Fv se determinó mediante un método de HPLC basado en Proteína-G.

Ejemplo 1

Generación y análisis de diferentes injertos de humanización de 645 en A26 Fab-645dsFv

30 Hemos descrito previamente el formato del anticuerpo Fab-dsFv (Figura 1B) y un anticuerpo anti-albúmina humanizado conocido como "645gH1gL1" en WO2010/035012. También hemos descrito previamente la generación de un anticuerpo anti-OX40 antagonista humanizado conocido como "A26" en WO2010096418. Aquí describimos la generación de un nuevo injerto humanizado mejorado de anticuerpo '645' conocido como 645dsgH5gL4 y la generación de una molécula de anticuerpo Fab-dsFv que incorpora ese injerto en el componente Fv y las regiones variables 'A26' en el componente Fab.

35 Las secuencias de 645gH1 y gL1 se dan en la Figura 3 (a) y (b), SEQ ID NOs 9 y 10.

Construcción de plásmidos A26 Fab-645dsFv (gH1gL1) y A26 Fab-645dsFv (gH5gL4).

40 La región codificante total de la cadena ligera A26 Fab-645dsFv (gL1) (SEQ ID NO: 12) se clonó en un vector de expresión de mamífero UCB bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA. La región variable de la cadena ligera de 645dsFv (gL1) (SEQ ID NO: 10) se mutó a 645dsFv (gL4) (SEQ ID NO: 4) mediante un método de PCR solapante. La región codificante total de la cadena pesada A26 Fab-645dsFv (gH1) (SEQ ID NO: 11) se clonó en un vector de expresión de mamífero UCB bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA. La región variable de la cadena pesada de 645dsFv (gH1) (SEQ ID NO: 9) se mutó a 645dsFv (gH5) (SEQ ID NO: 2) mediante un método de PCR solapante. Los constructos se verificaron por secuenciación.

Expresión de células de mamífero de A26 Fab-645dsFv (gH1gL1) y A26 Fab-645dsFv (gH5gL4)

45 Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de cadena pesada y ligera usando el reactivo de transfección 293fectina de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron plásmido de cadena pesada de 25 µg y plásmido de cadena ligera de 25 µg con 100 µl de 293fectina y 1700 µl de medio Optipro durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió entonces a 50x10⁶ células HEK293 en 50 ml de suspensión y se incubó durante 6 días con agitación a 37°C. Después de 6 días, el sobrenadante se recogió

mediante centrifugación a 1500xg durante 10 minutos para eliminar las células y luego se filtró estérilmente a 0.22 μm .

Purificación con proteína G de A26 Fab-645dsFv (gH1gL1) y A26 Fab-645dsFv (gH5gL4)

5 Los ~50 ml de sobrenadantes filtrados de 0.22 μm se concentraron a ~2 ml usando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante. Se aplicaron 1.8 ml de sobrenadante concentrado a 1 ml/min a una columna de 1 ml de Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 40 mM, pH7.4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 40 mM pH7.4 y el material unido se eluyó con glicina/HCl 0.1 M, pH2.7. El pico de elución se recogió y el pH se ajustó a ~ pH7 con Tris/HCl 2M pH 8.5. La elución ajustada al pH se concentró y se diafiltró en fosfato 20mM, NaCl 150 mM pH7,4 usando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante, hasta un volumen final de ~0,3 ml.

Análisis de exclusión de tamaño A26 Fab-645dsFv (gH1gL1) y A26 Fab-645dsFv (gH5gL4)

15 Las muestras purificadas de proteína G se analizaron por HPLC de exclusión por tamaño. Las muestras se separaron en una columna Superdex 200 10/300 GL Tricorn (GE Healthcare) desarrollada con un gradiente isocrático de PBS pH7.4 a 1 ml/min. La detección del pico se realizó a 280 nm y se calculó el peso molecular aparente por comparación con una curva estándar de proteínas de peso molecular conocidas frente al volumen de elución. El cambio del injerto de humanización de 645dsFv de gH1gL1 a gH5gL4 dio como resultado un aumento en el porcentaje de monómero del A26 Fab-645dsFv expresado de 59% a 71%, un aumento del 12%, sin ningún cambio en la estabilidad térmica de la dsFv (datos no mostrados) o en la afinidad de unión del dsFv a HSA (datos no mostrados).

Ejemplo 2

2.1 Cinética BIAcore para A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) que se une a OX40

25 En este y en todos los ejemplos posteriores, el A26 Fab-dsFv 645gH5gL4 tenía la secuencia de cadena pesada dada en SEC ID NO: 7 (Figura 2 (g)) y la secuencia de cadena ligera dada en SEC ID NO: 8 (Figura 2 (h)) es decir, la cadena pesada contenía el enlazador G4S, G4T, G4S dado en la SEQ ID NO: 5, figura 2 (e).

30 BIA (análisis de interacción biomolecular) se realizó con BIAcore T200 (GE Healthcare). Affinipure F(ab')₂ Fragmento anti-IgG humana de cabra, fragmento F(ab')₂ específico (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizó en un chip sensor CM5 mediante química de acoplamiento de amina hasta un nivel de captura de ~5000 unidades de respuesta (RUs). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, tensoactivo P20 0.05%, GE Healthcare) como tampón de funcionamiento con un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se usó una inyección de 10 μL de A26 Fab' a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o A26 Fab-dsFv a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la captura por la IgG-F(ab')₂ antihumana inmovilizada. El OX40 humano se tituló sobre el A26 capturado a diversas concentraciones (de 25 nM a 1,5625 nM) a un caudal de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La superficie se regeneró mediante una inyección de 2 x 10 μL de HCl 50 mM, seguido de una inyección de 5 μL de NaOH 5 mM a un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las curvas de unión de sustracción de fondo se analizaron usando el software T200evaluation (versión 1.0) siguiendo procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

| Muestra | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M) | KD (pM) |
|---------|----------------------|-----------|-----------|---------|
| Fab' | 2.18 \pm 0.38 E+05 | 1.00 E-05 | 4.68 E-11 | 46.8 |
| Fab-Fv | 2.55 + 0.35 E+05 | 1.04 E-05 | 4.12 E-11 | 41.2 |

Promedio de 4 determinaciones

2.2. Cinética BIAcore para A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) que se une a la albúmina.

40 Se realizó BIA (análisis de interacción biomolecular) usando un BIAcore T200 (GE Healthcare). Affinipure F(ab')₂ Fragmento anti-IgG humana de cabra, fragmento F(ab')₂ específico (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizó en un chip sensor CM5 mediante química de acoplamiento de amina hasta un nivel de captura de ~5000 unidades de respuesta (RUs). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH7.4, NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, tensoactivo P20 0.05%, GE Healthcare) como tampón de funcionamiento con un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se usó una inyección de 10 μL de Fab-Fv a 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la captura por la IgG-F(ab')₂ antihumana inmovilizada. La albúmina sérica humana (HSA), la albúmina sérica de ratón (MSA) y la albúmina sérica Cynomolgus (CSA) se titularon sobre el Fab-Fv capturado a diversas concentraciones (50 nM a 6.25 nM) a un caudal de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La superficie se regeneró mediante una inyección de 2 x 10 μL de HCl 50 mM, seguido de una inyección de 5 μL de NaOH 5 mM a un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Las curvas de unión de sustracción de fondo se analizaron usando el software T200evaluation (versión 1.0) siguiendo procedimientos estándar. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de

ajuste.

| Muestra | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M) | KD (nM) |
|---------|-----------|-----------|-----------|---------|
| HSA | 5.84 E+04 | 1.63 E-04 | 2.93 E-09 | 2.93 |
| MSA | 8.86 E+04 | 3.68 E-04 | 4.1 E-09 | 4.16 |
| CSA | 7.1 E+04 | 1.89 E-04 | 2.66 E-09 | 2.66 |

Promedio de 3 determinaciones

2.3 Demostración de A26 Fab-dsFv (645gH5gL4) que se une a OX40 y albúmina simultáneamente

- 5 Se evaluó la unión simultánea de OX40 humana y albúmina de suero humano a A26 Fab-dsFv. El constructo A26 Fab-dsFv se capturó en la superficie del chip sensor como se establece en el método para la cinética de Biacore para unir la albúmina A26 Fab-dsFv. HAS 50nM, OX40 25nM o una solución mixta con concentración final de 50nM de HSA y 25nM de OX40 se titularon por separado sobre el A26 Fab-dsFv capturado. La respuesta de unión para la solución combinada HSA/OX40 fue equivalente a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes. Esto confirma que el Fab-dsFv es capaz de unirse simultáneamente a OX40 y HSA humanos.

| Muestra | Analito | Unión (RU) |
|------------|-------------|------------|
| A26 Fab-Fv | hOX4 | 25 |
| | HSA | 9 |
| | hOX40 + HSA | 35 (34) |

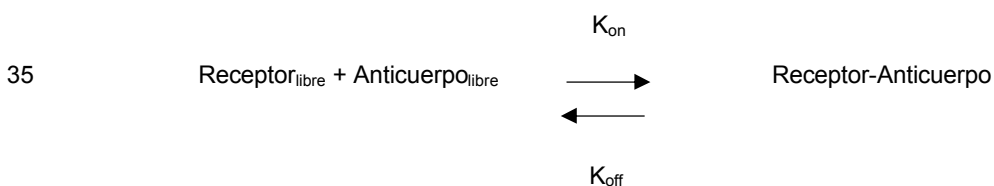
2.4 Afinidad basada en células de A26 Fab-dsFv (645gH5gL4)

Métodos:

A26 Fab-Fv que se une a células humanas activadas T CD4⁺OX40⁺.

- 15 Se aislaron PBMC por separación en un gradiente de Ficoll y se activaron con 4 mg/ml de PHA-L durante 3 días a 37°C, 5% de CO₂, 100% de humedad. Las células T CD4⁺ se aislaron mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas (kit de aislamiento de células T CD4⁺ II para humanos, Miltenyi Biotec). Aproximadamente 1 x 10⁵ células se incubaron en presencia de anticuerpo en tampón Facs (PBS/0.2% BSA/0.9% NaN₃) o tampón Facs complementado con HSA al 5% a 4°C. La concentración final del anticuerpo varió de 48 nM a 0.0005 nM). Las células se lavaron en PBS antes del análisis por citometría de flujo usando un FACScalibur (Becton Dickinson). Se produjeron dos conjuntos de datos de titulación en ambas condiciones de tampón, uno con A26 Fab-dsFv y el segundo con un Fab-Fv de control irrelevante para determinar vinculante no específico. El número de moles de anticuerpo unido se calculó usando valores interpolados de una curva patrón generada por el uso de perlas compuestas de cantidades diferentes pero conocidas de colorante fluorescente. Los valores de fluorescencia media geométrica se determinaron en los análisis citométricos de flujo de células y perlas. La unión no específica se restó de los valores A26 Fab-dsFv y la curva de unión específica así generada se analizó mediante regresión no lineal usando una ecuación de unión de un sitio (Graphpad Prism®) para determinar la K_D. Para determinar la afinidad del A26 Fab-dsFv para el antígeno expresado en la superficie celular, se realizaron experimentos de unión a saturación utilizando células T CD4⁺OX40⁺ activadas, y A26 Fab-dsFv marcado con Alexa Fluor 488. La unión específica del anticuerpo al receptor en equilibrio a lo largo de un intervalo de concentraciones de anticuerpo se usó para determinar K_D, suponiendo que solo una fracción muy pequeña de anticuerpo se unió al receptor en cualquier punto de la curva de unión.

La unión de equilibrio se describe usando la siguiente ecuación:



La tasa de asociación de anticuerpo con receptor = $K_{on} \times [\text{Receptor}_{\text{libre}}] \times [\text{Anticuerpo}_{\text{libre}}]$

La tasa de disociación del complejo receptor-anticuerpo = $k_{off} \times [\text{Receptor-Anticuerpo}]$

5 En equilibrio, las velocidades de asociación y disociación son iguales y se puede derivar una ecuación que describe la isoterma de unión; en un diagrama semilogarítmico, la unión es sigmoidal. La K_D se define por k_{off}/k_{on} y se puede calcular a partir de la curva de unión como la concentración a la que se produce la unión semimáxima.

La unión del A26 Fab-Fv marcado con AlexaFluor488 a las células T CD4⁺OX40⁺ humanas activadas se midió por citometría de flujo en un intervalo de concentración de 5 log.

En la Figura 4 se muestra una curva de unión representativa para A26 Fab-Fv.

El valor medio de K_D obtenido en células activadas de 5 donantes diferentes es 145 pM.

10 Ejemplo 3 Expresión de 645gL4gH5 como scFv

Construcción de plásmidos

15 Los scFv se expresaron a partir de uno de dos plásmidos de expresión de mamífero modificados por UCB estrechamente relacionados; pVKΔPvuII se usó para clonación y expresión de scFv en la orientación HL, mientras que pKHΔEcoRV se usó para clonación y expresión de scFv en la orientación de LH. Todos los scFv se diseñaron para contener un péptido enlazador de 20 aminoácidos, (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 17) y un marcador 10xHis C-terminal. Los plásmidos aceptores scFv 362HL y 240LH codifican sitios de restricción únicos en los bordes FW1-FW4 de vH (PvuII y XhoI) y vL (EcoRV y BsmI) que permiten la clonación de restricción de las regiones variables scFv subsiguientes en una ligación en dos etapas. Los genes que codifican 645gH5 vH y 645gL4 vL se sintetizaron mediante DNA2.0, con oscilaciones de cisteína en las posiciones de Kabat vH44 y vL100 para la generación de scFv estabilizado con disulfuro (ds). Estos genes de la región V se clonaron en plásmidos scFv aceptores usando PvuII y XhoI (vH) o EcoRV y BsmI (vL) y se verificó la ligación con éxito mediante secuenciación de ADN.

Expresión y Purificación

25 Se transfectaron células HEK293F (cultivos de 50 ml a 106 células/ml) con 50 mg de ADN plásmido y se cultivaron a 37°C en medios FreeStyle™. Los sobrenadantes se recogieron 6 días después de la transfección y scFv se purificaron mediante purificación discontinua de Ni²⁺ + -NTA. La proteína purificada se concentró y se cambió el tampón en PBS para la posterior caracterización biofísica.

Ensayo de termoestabilidad

30 Se realizó un ensayo de termofluor para evaluar las estabildades térmicas de las moléculas purificadas. Las proteínas purificadas (0.1 mg/ml) se mezclaron con colorante SYPRO® Orange (Invitrogen), y la mezcla se dispensó por cuadruplicado en una placa de pocillos ópticos de PCR 384. Las muestras se analizaron en un sistema de PCR rápido en tiempo real 7900HT (Agilent Technologies) en un rango de temperatura de 20°C a 99°C, con una velocidad de aumento de 1.1 °C/min. Los cambios de intensidad de fluorescencia por pocillo se representaron frente a la temperatura y los puntos de inflexión de las pendientes resultantes se usaron para generar la T_m.

HPLC de exclusión de tamaño

35 Se analizaron proteínas purificadas (10 µg y 50 µg) por HPLC de exclusión por tamaño en una Columna Tricorn Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Se usó un gradiente isocrático de PBS pH7.4 a un caudal de 1 ml/min, con detección UV a 214 nm y 280 nm.

Resumen de resultados

645gH5gL4 HLds dio 97% de monómero y una T_m en °C de 75.6.

40 645gH5gL4 HL dio 86% de monómero y una T_m en °C de 75.6.

Ejemplo 4

Construcción de las fusiones FabA-dsscFv

Plásmidos para la expresión en células de mamíferos.

45 Se construyó una cadena única de Fv (scFv) uniendo los dominios de la región variable de cadena ligera y pesada de un anticuerpo de unión a albúmina de suero humano (SEQ ID: 1 y 3 o 2 y 4) a través de un enlazador flexible (SEQ ID: 17) en la orientación HL. Las mutaciones puntuales se introdujeron en las secuencias de ADN en residuos seleccionados en la región marco tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de Fv. Las mutaciones se introdujeron para crear un enlace disulfuro intercadena entre las cadenas pesada y ligera de Fv, la cadena pesada G44C y la cadena ligera G100C para formar un scFv unido por disulfuro (dsscFv). Las proteínas de fusión FabA-

5 dsscFv se construyeron fusionando un dsscFv al término C de la región constante de la región ligera (con el alotipo Km3 de la región constante kappa) o cadena pesada de FabA (región constante gamma-1 CH1 humana, isotipo γ 1). Se usó un conector flexible (SEQ ID NO: 18 y 5) para unir el scFv a la región cKappa (SEQ ID NO: 19) o la región CHI (SEQ ID NO: 20), respectivamente. El FabA-dsscFv (CL-dsscFv), FabA-dsscFv (CH1-dsscFv), la cadena ligera de FabA y la cadena pesada de FabA se fabricaron químicamente y luego se clonaron en vectores de expresión de mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E.

Se muestran diversos datos para estos constructos en las Figuras 7 a 13. Los datos de termoestabilidad para los constructos dieron una T_m para cada uno de alrededor de 82 °C.

Que comprende en el contexto de la presente memoria debe significar que incluye.

10 Cuando sea técnicamente apropiado se pueden combinar realizaciones de la invención. Las realizaciones se describen en este documento como que comprenden ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a realizaciones separadas que consisten o consisten esencialmente de dichas características/elementos.

15 Por supuesto, se entenderá que la presente invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente, de ninguna manera pretende ser limitativa, y que las modificaciones de los detalles se pueden realizar dentro del alcance de las reivindicaciones a continuación. Las características preferidas de cada realización de la invención son como para cada una de las otras realizaciones *mutatis mutandis*.

Listado de secuencias

- 20 <110> UCB Pharma S.A
- <120> Anticuerpos de Unión a Albumina y Fragmentos de Unión de los Mismos
- <130> G0161-WO01
- 25 <150> US61/558,599
- <151> 11-11-2011
- <160> 71
- 30 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 121
- <212> PRT
- 35 <213> Artificial
- <220>
- <223> Dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-albúmina (no ds)
- 40 <400> 1

ES 2 649 098 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 121
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-albúmina (ds)

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 649 098 T3

<210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera de anticuerpo anti-albúmina (no ds)

 10 <400> 3

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

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
 20 25 30

 Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

 Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110
 15
 <210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera de anticuerpo anti-albúmina (ds)

 <400> 4
 25

ES 2 649 098 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
 20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

5 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Enlazador 1
 <400> 5

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

15 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Enlazador 2
 <400> 6

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

25 <210> 7
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> A26 Fab Pesada-(G4S,G4T,G4S)-645dsFv(gH5)

35 <400> 7

ES 2 649 098 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Pro Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

ES 2 649 098 T3

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
 210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
 260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
 275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
 290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
 325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
 355

<210> 8
 <211> 341
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> A26 Fab Ligerá-(3xG4S)-645dsFv(gL4)

10 <400> 8

ES 2 649 098 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Tyr Asn Ala
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
 225 230 235 240
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
 245 250 255

ES 2 649 098 T3

Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 260 265 270

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
 275 280 285

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 290 295 300

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly
 305 310 315 320

Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val
 325 330 335

Glu Ile Lys Arg Thr
 340

<210> 9
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Dominio variable de cadena pesada 645gH1

10

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met
 65 70 75 80

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

Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15

<210> 10
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Dominio variable de cadena ligera 645gL1

ES 2 649 098 T3

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

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

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

Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

5

<210> 11
<211> 355
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> A26 Fab Pesada-(3xG4S)-645dsFv(gH1)

15

<400> 11

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

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

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

ES 2 649 098 T3

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

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

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

Ala Thr Gly Gly Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

ES 2 649 098 T3

Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro Gly Tyr
325 330 335

Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
340 345 350

Val Ser Ser
355

<210> 12
<211> 340
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL1)

10

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

ES 2 649 098 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 225 230 235 240

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
 245 250 255

Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 260 265 270

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly
 275 280 285

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 290 295 300

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly
 305 310 315 320

Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys
 325 330 335

Val Glu Ile Lys
 340

<210> 13
 <211> 789
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> 645 gH5gL4

<400> 13

gaggttcagc tgetggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc

60

ES 2 649 098 T3

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgcga ttaactgggt acgtcaggca 120
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtacgac cttctacgct 180
 acttgggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240
 cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttccg 300
 ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360
 agtggagggtg gcggttctgg cgggtggcgg tccggtggcg gtggatcggg aggtggcggg 420
 tctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 480
 actattacct gtcagtcctc tccgagcgtt tggccaact tcctgagctg gtaccagcag 540
 aaaccgggta aagccccgaa actgctgac tacgaggcgt ctaaactgac ctctggtgta 600
 ccgtcccgtt tctctggctc tggctctggt acggacttca ctctgacat ctctctctg 660
 cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtggtggtt actcttccat ctctgacacc 720
 acgttcggtg gaggcaccaa agttgaaatc aaacgtacgc atcaccatca ccatcaccat 780
 caccatcac 789

<210> 14
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> 645 gH5gL4

10

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

ES 2 649 098 T3

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
130 135 140

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
180 185 190

Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr His His His
245 250 255

His His His His His His His
260

<210> 15
 <211> 789
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> 645 gH5gL4ds

<400> 15

gaggttcagc tgctggagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc 60

tcttgtgcag taagcggcat cgacctgtcc aactacgga ttaactgggt acgtcaggca 120

ccgggtaaat gcctggaatg gatcggcatc atctgggcct ctggtacgac cttctacgct 180

acttgggcca aaggtcgttt caccatctcc cgtgacaact ctaaaaacac cgtgtacctg 240

cagatgaact ctctgcgtgc ggaagacact gcggtttact attgcgcgcg taccgttcog 300

ggctattcta ctgcaccgta cttcgacctg tggggtcagg gtactctggt taccgtctcg 360

ES 2 649 098 T3

agtggagggtg gcggttctgg cgggtggcggg tccggtggcg gtggatcggg aggtggcggg 420
 tctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtgtttccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 480
 actattacct gtcagtcctc tccgagcgtt tggccaact tcctgagctg gtaccagcag 540
 aaaccgggta aagccccgaa actgctgac taccgagcgt ctaaactgac ctctggtgta 600
 ccgtcccgtt tctctggctc tggctctggt acggacttca ctctgacat ctctctctg 660
 cagccggaag actttgcaac gtactactgc ggtggtgggt actcttccat ctctgacacc 720
 acgttcgggtt gtggcaccaa agttgaaatc aaacgtacgc atcaccatca ccatcaccat 780
 caccatcac 789

<210> 16
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> 645 gH5gL4ds

10

<400> 16

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 130 135 140

ES 2 649 098 T3

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser
165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
180 185 190

Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
210 215 220

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr His His His
245 250 255

His His His His His His His
260

5 <210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador
<400> 17

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

Gly Gly Gly Ser
20

15 <210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Enlazador
<400> 18

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

30 <210> 19
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cKappa

ES 2 649 098 T3

<400> 19

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1 5 10 15

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
35 40 45

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
50 55 60

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
65 70 75 80

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

5 <210> 20
<211> 103
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> CH1

<400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

15 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
100

20 <210> 21
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 5 <400> 21
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 1 5
 10 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 22
Asp Lys Thr His Thr Ser
 20 1 5
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 30 <400> 23
Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 35 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Enlazador
 <400> 24
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 45 1 5 10
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 25
 55 **Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 21
 60 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

5 <400> 26

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

Gly Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Enlazador

<400> 27

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

20 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Enlazador

<400> 28

30 Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10

<210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Enlazador

40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

45 <400> 29

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10 15

50 <210> 30
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>

ES 2 649 098 T3

<223> Enlazador

<220>
 <221> característica_misc
 5 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<400> 30

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Ser Ala Ser
 15 20

<210> 31
 <211> 26
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

40 <400> 31

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 20 25

<210> 32
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 55 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

<220>

<221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

15 <400> 32

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 20 25 30

20 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Enlazador

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural

35 <400> 33

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10

40 <210> 34
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Enlazador

<400> 34

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr
 1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Pro Gly Gly Asn
 20 25 30

Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser
 35 40 45

Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
 50 55

50 <210> 35
 <211> 11

ES 2 649 098 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Enlazador

 <400> 35

 Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
 1 5 10
 10
 <210> 36
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Enlazador

 <400> 36
 20
 Ala Thr Thr Thr Gly Ser
 1 5

 <210> 37
 <211> 21
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador
 30
 <400> 37

 Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu
 1 5 10 15

 Ser His Lys Ser Pro
 20
 35 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Enlazador

 <400> 38

 Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 45 1 5 10 15

 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 55 <400> 39

 Gly Gly Gly Gly Ile Ala Pro Ser Met Val Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 649 098 T3

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 40
 10
 Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Enlazador
 20
 <400> 41
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 25
 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 42
 Gly Gly Gly Gly Asn Leu Ile Thr Ile Val Gly Gly Gly Gly Ser
 35 1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Enlazador
 45
 <400> 43
 Gly Gly Gly Gly Val Val Pro Ser Leu Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 50
 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 55
 <400> 44
 Gly Gly Glu Lys Ser Ile Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 60
 <210> 45

ES 2 649 098 T3

<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Enlazador

<400> 45

Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val
1 5 10 15

10 Arg Pro

<210> 46
<211> 18
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

20 <400> 46

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu
1 5 10 15

Thr Thr

25 <210> 47
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
30 <223> Enlazador

<400> 47

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr
1 5 10 15

35 Phe Asn

<210> 48
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Enlazador

<400> 48

45 Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu
1 5 10 15

Pro Ala

<210> 49
<211> 18
50 <212> PRT
<213> Artificial

ES 2 649 098 T3

<220>
<223> Enlazador

<400> 49

5 Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile
1 5 10 15

Arg Thr

<210> 50
<211> 18
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador

15 <400> 50

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala
1 5 10 15

Phe Gly

20 <210> 51
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Enlazador

<400> 51

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu
30 1 5 10 15

Gly Ala

35 <210> 52
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> Enlazador

<400> 52

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro
1 5 10 15

Asp Leu

45 <210> 53
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Enlazador

<400> 53

ES 2 649 098 T3

Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro
1 5 10 15

Ser Leu

5 <210> 54
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Enlazador

<400> 54

Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg
1 5 10 15

Ile Ser

15 <210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Enlazador

<400> 55

25 Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15

Pro

30 <210> 56
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Enlazador

<400> 56

Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe
1 5 10 15

Pro Pro

40 <210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Enlazador

<400> 57

ES 2 649 098 T3

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
 1 5 10 15

Pro Tyr

<210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Enlazador

10

<400> 58

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
 1 5 10 15

Pro

15

<210> 59
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Enlazador

25

<400> 59

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn
 1 5 10 15

Leu Arg

<210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Enlazador

35

<400> 60

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr
 1 5 10 15

Phe Pro

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Enlazador

45

<400> 61

50

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
 1 5 10

<210> 62
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 62
 10
Pro Pro Pro Pro
 1
 <210> 63
 <211> 8
 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 20
 <400> 63
Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 1 5
 25
 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 64
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 35 1 5 10
 <210> 65
 <211> 18
 <212> PRT
 40
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador
 45
 <400> 65
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15
Pro Ala
 50
 <210> 66
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 55
 <223> Enlazador
 <400> 66

ES 2 649 098 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
 1 5 10 15

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 20 25

5 <210> 67
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Enlazador

<400> 67

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr Leu
 1 5 10 15

Tyr Asn Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
 20 25 30

15 <210> 68
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Enlazador

<400> 68

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Gly Lys Pro Thr His
 1 5 10 15

25 Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
 20 25 30

30 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador

35 <400> 69

Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

40 <210> 70
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Enlazador

<400> 70

ES 2 649 098 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala
20 25

<210> 71

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

10

<400> 71

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de unión a albúmina sérica o fragmento del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3.
- 5 2. Un anticuerpo de unión a albúmina sérica o fragmento del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia dada SEQ ID NO: 4.
- 10 3. Un anticuerpo o fragmento de unión a albúmina sérica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el anticuerpo o fragmento se selecciona del grupo que consiste en un Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpo de dominio variable único, scFv, anticuerpo bi, tri o tetravalente, Bis-scFv, diacuerpo, triacuerpo, tricuerpo, DVD-Ig y BiTE.
- 15 4. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífica que comprende:
una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el N-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (VH1), un dominio CH1 y un segundo dominio variable de cadena pesada (VH2),
una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el N-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (VL1), un dominio CL
y un segundo dominio variable de cadena ligera (VL2),
en donde dichas cadenas pesada y ligera están alineadas de manera que VH1 y VL1 forman un primer sitio de unión a antígeno y VH2 y VL2 forman un segundo sitio de unión a antígeno,
20 donde el antígeno unido por el segundo sitio de unión a antígeno es albúmina de suero humano y en donde el segundo dominio variable de la cadena pesada (VH2) tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 y el segundo dominio variable de cadena ligera (VL2) tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3, y
el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) y el segundo dominio variable de la cadena ligera (VL2) están opcionalmente unidos por un enlace disulfuro.
- 25 5. Una proteína de fusión de anticuerpo biespecífica que comprende:
una cadena pesada que comprende, en secuencia desde el N-terminal, un primer dominio variable de cadena pesada (VH1), un dominio CH1 y un segundo dominio variable de cadena pesada (VH2),
una cadena ligera que comprende, en secuencia desde el N-terminal, un primer dominio variable de cadena ligera (VL1), un dominio CL y un segundo dominio variable de cadena ligera (VL2),
30 donde dichas cadenas pesada y ligera están alineadas de manera que VH1 y VL1 forman un primer sitio de unión a antígeno y VH2 y VL2 forman un segundo sitio de unión al antígeno,
donde el antígeno unido por el segundo sitio de unión a antígeno es albúmina de suero humano,
donde el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) tiene la secuencia dada en SEQ ID N°: 2 y el segundo dominio variable de cadena ligera (VL2) tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 4 y
35 el segundo dominio variable de cadena pesada (VH2) y el segundo dominio de cadena ligera (VL2) están opcionalmente unidos mediante un puente disulfuro.
6. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector que comprende un polinucleótido como se define en la reivindicación 6.
- 40 8. Una célula huésped que comprende un polinucleótido de la reivindicación 6 o un vector de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Un proceso de producción de un anticuerpo o fragmento definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende expresarlo a partir de una célula huésped como se define en la reivindicación 8.
- 45 10. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
11. Uso de un anticuerpo o fragmento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la fabricación de un medicamento.

12. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento.

Figura 1A

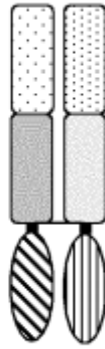
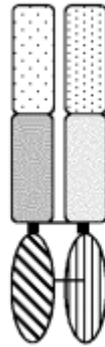


Figura 1B










- Primera Región variable de cadena ligera VL1 
- Primera Region Variable de cadena pesada VH1 
- Regiones Constante cKappa  y CH1 
- Segunda Región Variable de cadena ligera VL2 
- Segunda Región variable de cadena pesada VH2 
- Unión disulfuro 

Figura 2

- (a) Dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-albumina (no ds) (SEQ ID NO:1)

EVQLLES GGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

- (b) Dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-albumina (ds) (SEQ ID NO:2)

EVQLLES GGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSS

- (c) Dominio variable de cadena ligera de anticuerpo anti-albumina (no ds) (SEQ ID NO:3)

DIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS GVP SRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD TTFGGGTKVEIKRT

- (d) Dominio variable de cadena ligera de anticuerpo anti-albumina (ds) (SEQ ID NO:4)

DIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS GVP SRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD TTFGCGTKVEIKRT

- (e) Enlazador 1 (SEQ ID NO: 5)

SGGGGSGGGGTGGGGS

- (f) Enlazador 2 (SEQ ID NO: 6)

GGGSGGGGSGGGGS

- (g) A26 Fab Pesada-(G4S, G4T, G4S)-645dsFv(gH5) (SEQ ID NO: 7)

EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASI SPSGGLTYRDSVKGRFT
ISRDDAKNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKEPKSCSGGGGSGGGGTGGGGSEVQLLES GGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQA
PGKCLEWIGI IWASGTTFYATWAKGRFTISRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFD
LWGQGLVTVSS

- (h) A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL4) (SEQ ID NO: 8)

DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVP SRFSASGSGT
DSTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPK
LLIYEASKLTS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD TTFGCGTKVEIKRT

Figura 3

Dominio variable de cadena pesada 645gH1 (SEQ ID NO: 9)

EVQLLES¹GGGLV²QPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDSTTVYLQMN³SLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT⁴LVTVSS

Dominio variable de cadena ligera 645gL1 (SEQ ID NO: 10)

DIVMTQSPSSVSASVGD¹RVITITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFK²SGSGG
TDFTLT³ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD⁴TFGCGTKVEIK

A26 Fab Pesada-(3xG4S)-645dsFv(gH1) (SEQ ID NO: 11)

EVQLVESGGGLV¹QPGGSLRLSCAASGFTFTNYGIHWIRQAPGKGLEWVASISPSGGLTY²YRDSVKGRFT
ISRDDAKNSPYLQMN³SLRAEDTAVYYCATGGEGIFDYWGQGT⁴LVTVSSASTKGPSVFP⁵LAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV⁶TVPSSSLGTQTYICNVN⁷HKPS
NTKVDK⁸VEPKSCSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES⁹GGGLV¹⁰QPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQA
PGKCLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISR¹¹DSTTVYLQMN¹²SLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLW
GQGT¹³LVTVSS

A26 Fab Ligera-(3xG4S)-645dsFv(gL1) (SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSLSASVGD¹RVITITCRATQSIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNANTLHTGVPSRFSASGSGT
DSTLT²ISSLQPEDFATYYCQYYDYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV³VCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK⁴DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP⁵VTK
SFNRGECSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGD⁶RVITITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPK
LLIYEASKLTSGVPSRFK⁷SGSGGTDFTLT⁸ISSLQPEDFATYYCGGGYSSISD⁹TFGCGTKVEIK

Figura 4

645 gH5gL4 (SEQ ID NO: 13)

GAGGTTGAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCA
GTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACACGCGATTAACCTGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAA
TGGATCGGCATCATCTGGGCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTACCATC
TCCCGTGACAACCTCTAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGGAAAGACTGCGGTT
TACTATTGCGCGCTACCGTTCCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTACGGGTACT
CTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGT
GGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACT
ATTACCTGTGAGTCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACCTCCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAA
GCCCCGAAACTGCTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCTCT
GGCTCTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTCGCAACGTACTACTGC
GGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCAGTTCGGTGGAGGCACCAAGTTGAAATCAAACGTACG
CATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4 (SEQ ID NO: 14)

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSDNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSVGPVSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKVEIKRTHHHHHHHHHH

645 gH5gL4ds (SEQ ID NO: 15)

GAGGTTGAGCTGCTGGAGTCTGGAGGCGGGCTTGTCAGCCTGGAGGGAGCCTGCGTCTCTCTTGTGCA
GTAAGCGGCATCGACCTGTCCAACACGCGATTAACCTGGGTACGTCAGGCACCGGGTAAATGCTGGAA
TGGATCGGCATCATCTGGGCTCTGGTACGACCTTCTACGCTACTTGGGCCAAAGGTCGTTTACCATC
TCCCGTGACAACCTCTAAAAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCAGGAAAGACTGCGGTT
TACTATTGCGCGCTACCGTTCCGGGCTATTCTACTGCACCGTACTTCGACCTGTGGGGTACGGGTACT
CTGGTTACCGTCTCGAGTGGAGGTGGCGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCCGGTGGCGGTGGATCGGGAGGT
GGCGGTTCTGATATCCAGATGACCCAGAGTCCAAGCAGTGTTCGCCAGCGTAGGCGATCGTGTGACT
ATTACCTGTGAGTCTCTCCGAGCGTTTGGTCCAACCTCCTGAGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAA
GCCCCGAAACTGCTGATCTACGAGGCGTCTAAACTGACCTCTGGTGTACCGTCCCGTTTCTCTGGCTCT
GGCTCTGGTACGGACTTCACTCTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCGGAAGACTTTCGCAACGTACTACTGC
GGTGGTGGTTACTCTTCCATCTCTGACACCAGTTCGGTGTGGCACCAAGTTGAAATCAAACGTACG
CATCACCATCACCATCACCATCACCATCAC

645 gH5gL4ds (SEQ ID NO: 16)

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSDNYAINWVRQAPGKLEWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTI
SRDNSKNTVYLQMNLSRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPKAPKLLIYEASKLTSVGPVSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKVEIKRTHHHHHHHHHH

Figura 5

ENLAZADOR (SEQ ID NO: 17)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGG

ENLAZADOR (SEQ ID NO: 18)

SGGGGSGGGGSGGGG

cKappa (SEQ ID NO: 19)

VAA[~]PSVFI[~]FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST
LTLKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CH1 (SEQ ID NO: 20)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC

Figura 6

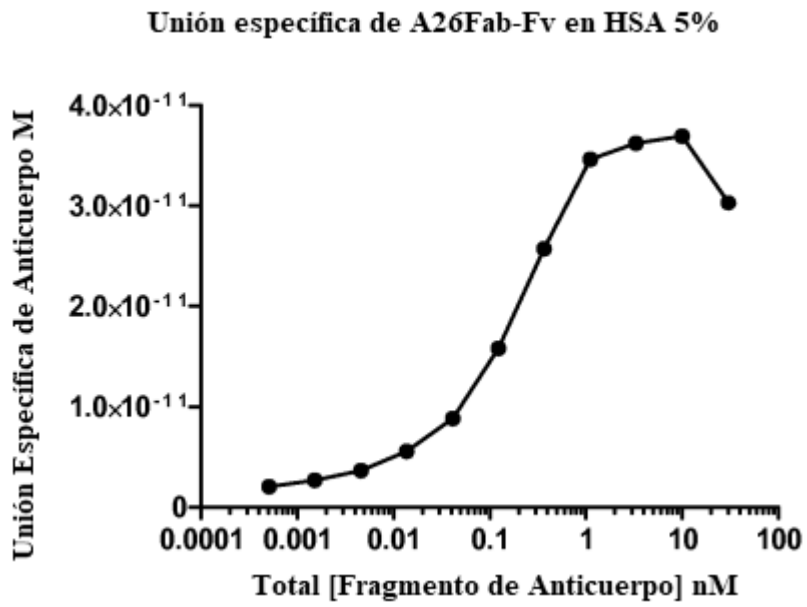


Figura 7

Expresión transitoria de A26-645gH5gL4 FabA-dsscFv en línea celular HEK293

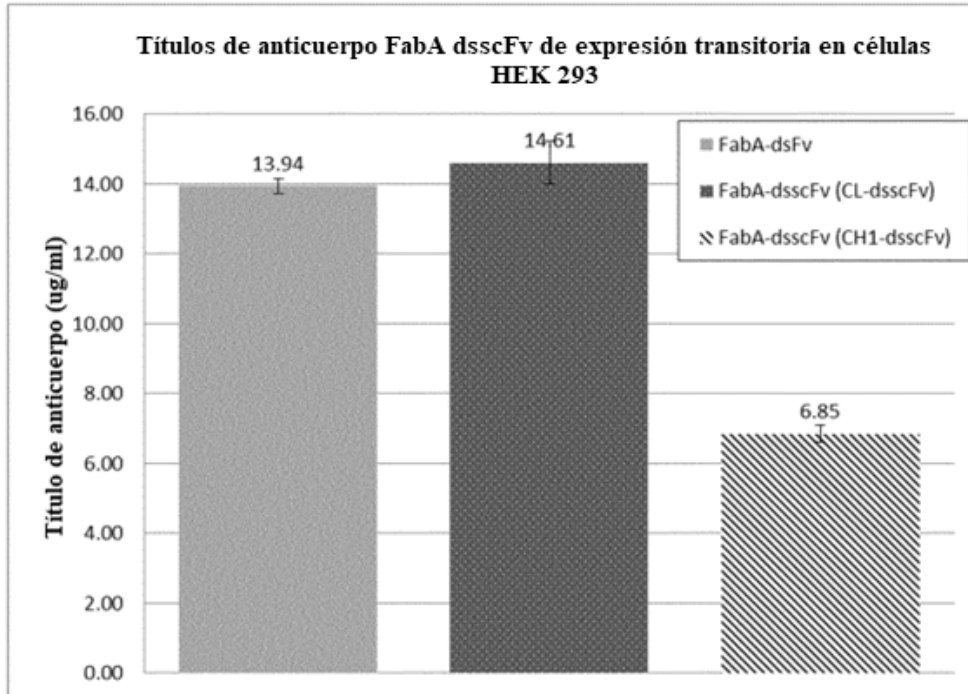


Figura 8

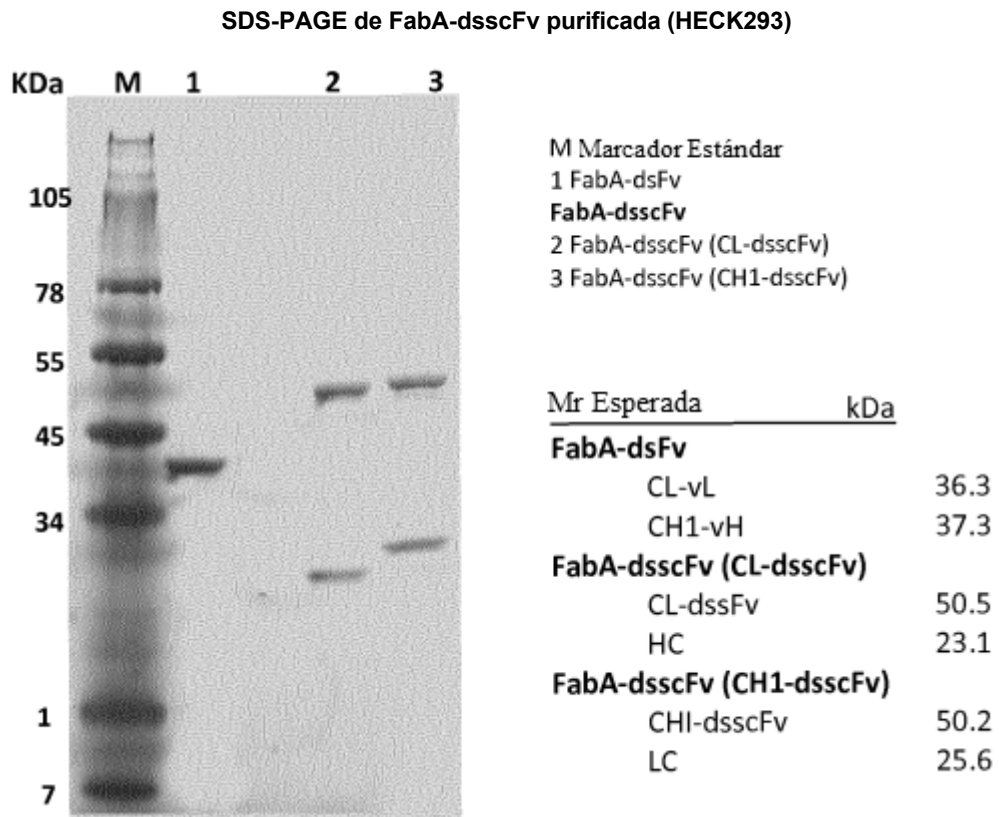


Figura 9

Afinidad a Unión de HSA y Antígeno A (HEK293)

| | Analito | | Concentración usada | Ka (1/Ms) | Kd (1/s) | KD (M) | KD (nM) |
|--------------------------|---------|---------------------|-----------------------------|-----------|----------|----------|---------|
| FabA-dsscFv (CL-dsscFv) | HSA | Titulación | 50 nM, 25nM, 12.5nM, 6.25Nm | 1.83E+05 | 2.40E-04 | 1.31E-09 | 1.31 |
| | | Concentración única | 50 nM | 1.65E+05 | 2.11E-04 | 1.28E-09 | 1.28 |
| FabA-dsscFv (CH1-dsscFv) | HSA | Titulación | 50 nM, 25nM, 12.5nM, 6.25Nm | 1.72E+05 | 2.22E-04 | 1.29E-09 | 1.29 |
| | | Concentración única | 50 nM | 1.60E+05 | 1.99E-04 | 1.25E-09 | 1.25 |
| FabA-dsFv | HSA | Titulación | 50 nM, 25nM, 12.5nM, 6.25nM | 7.51E+04 | 1.51E-04 | 2.01E-09 | 2.01 |
| | | Concentración única | 50 nM | 6.06E+04 | 1.19E-09 | 1.96E-09 | 1.96 |

FIGURA 10

| | Analito | | Concentración | Ka (1/Ms) | Kd (1/s) | KD (M) | KD (pM) |
|--------------------------|------------|---------------------|---------------|-----------|----------|----------|---------|
| FabA-dsscFv (CH1-dsscFv) | Antígeno A | Concentración única | 25Nm | 1.66E+05 | 2.34E-05 | 1.41E-10 | 141 |
| FabA-dsscFv (CL-dsscFv) | Antígeno A | Concentración única | 25Nm | 1.78E+05 | 1.82E-05 | 1.02E-10 | 102 |
| FabA-dsFv | Antígeno A | Concentración única | 25Nm | 1.70E+05 | 1.53E-05 | 9.00E-11 | 90 |

Figura 11

FabA-dsscFv (CHO)

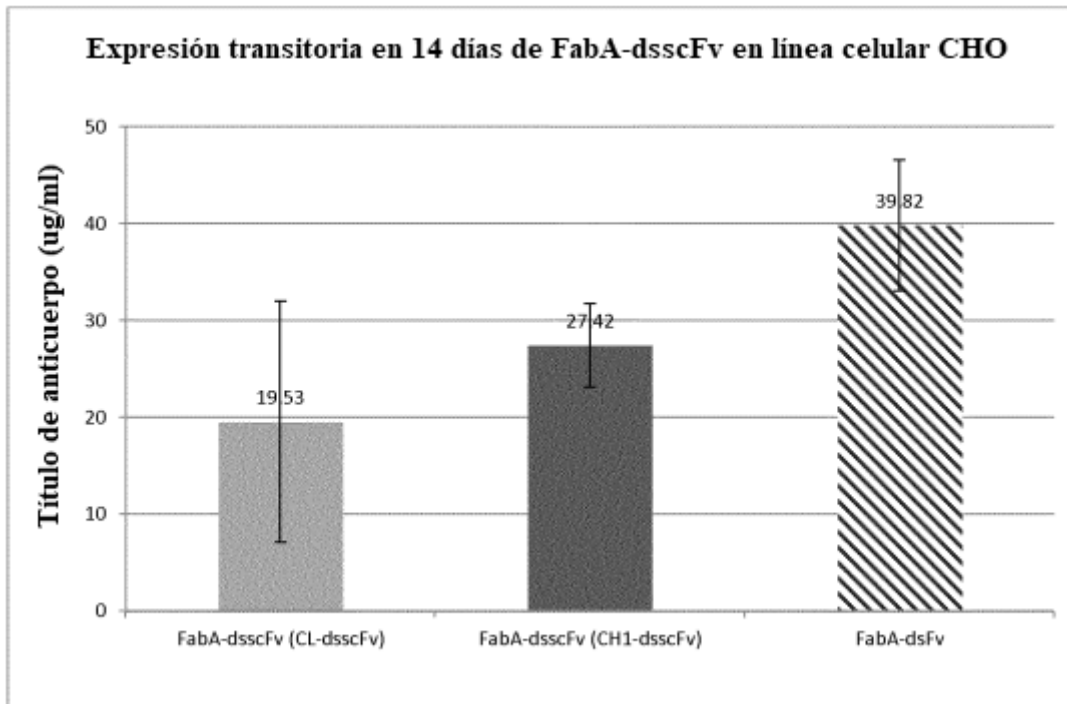


Figura 12

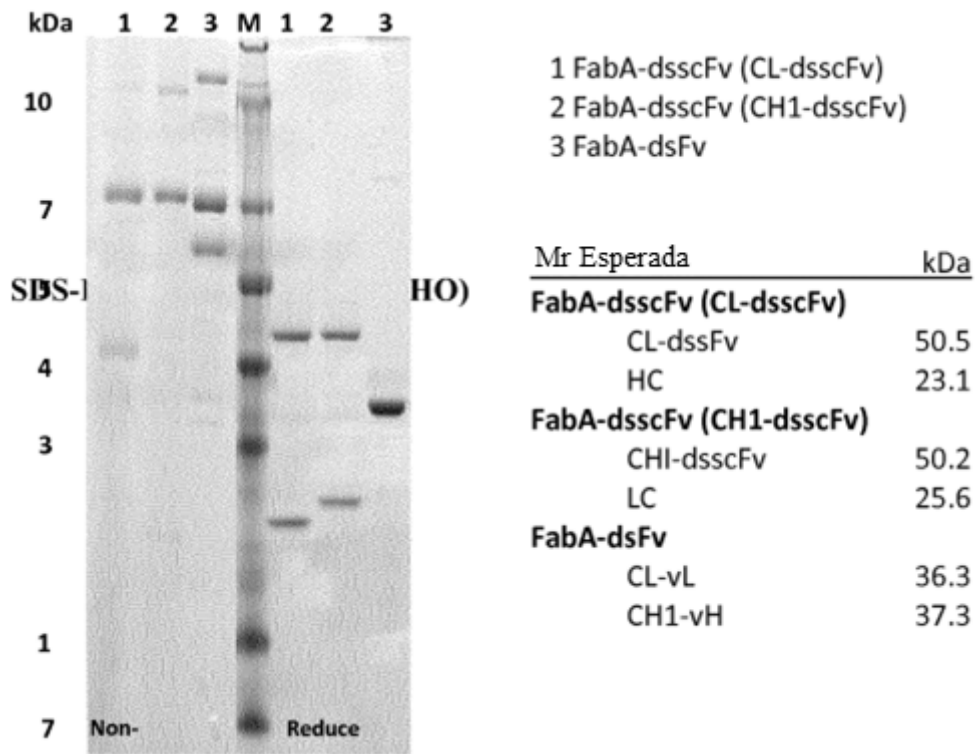


Figura 13

Termoestabilidad de FabA-dsscFv (CHO)

| | Tm 1 | Tm 1 Desv. Est. | Tm 2 | Tm 2 Desv. Est. | Tm 3 | Tm 3 Desv. Est. |
|--------------------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-----------------|
| FabA-dsscFv (CL-dsscFv) | 83.8 | 0.2 | 73.6 | 0.5 | 52.4 | 0.7 |
| FabA-dsscFv (CH1-dsscFv) | 84.6 | 0.3 | 75.5 | 0.5 | 57.8 | 0.6 |
| FabA-dsFv | 84 | 0.2 | 73.9 | 0.3 | ND | ND |