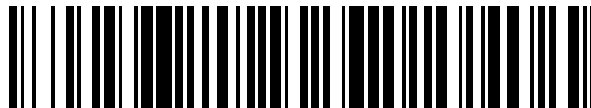


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 309**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2007** **E 15190901 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017** **EP 3009448**

54 Título: **Polipéptidos Fc monocatenarios**

30 Prioridad:

25.07.2006 GB 0614780

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

25.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LAWSON, ALASTAIR DAVID GRIFFITHS y
STEPHENS, PAUL EDWARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 651 309 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

Polipéptidos Fc monocatenarios

La presente invención se refiere a polipéptidos monocatenarios que comprenden uno o varios dominios Fc de inmunoglobulina. En particular, la presente invención se refiere a polipéptidos monocatenarios en los que al menos se forma un dominio Fc funcional dentro de la cadena.

Las inmunoglobulinas son moléculas bivalentes con forma Y que comprenden dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Los enlaces disulfuro unen entre sí las parejas de cadenas ligeras y pesadas, así como las dos cadenas pesadas. Cada cadena consiste en un dominio variable cuya secuencia varía y que es responsable de la fijación al antígeno, que se conocen como dominios V_H y V_L para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Cada cadena también consiste en al menos un dominio constante. En la cadena ligera hay un único dominio constante (C_L) y en la cadena pesada hay al menos tres (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}), a veces cuatro (C_{H4}), en función del isotipo. En los humanos hay cinco clases o isotipos diferentes de anticuerpos, que incluyen IgA (que incluye IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), e IgM.

El dominio Fc de un anticuerpo comprende típicamente al menos los dos dominios de la región constante de la cadena pesada de cada cadena que están dimerizados para formar el dominio Fc. El dominio Fc se encarga de proporcionar funciones efectoras al anticuerpo, entre ellas la determinación de la semivida y de la distribución del anticuerpo por todo el cuerpo, la capacidad para fijarse al complemento y la fijación a los receptores de Fc de la superficie celular. Las propiedades de los dominios Fc los han convertido en agentes terapéuticos útiles y los dominios Fc han sido fusionados a otras proteínas que no son anticuerpos, tales como proteínas receptoras, p. ej., etanercept. Las fusiones del dominio Fc también se han utilizado como reactivos de investigación, 'etiquetas Fc', lo que facilita la detección y la purificación de la proteína de fusión. Además, también están descritas numerosas estructuras de anticuerpo alternativas que comprenden dominios Fc, véase por ejemplo Dumont et al., 2006, *Biodrugs*, 20(3) 151-160, las solicitudes de patente internacional WO 2005001025, WO 2005077981, y WO 2005017148, y Hayden et al., 1994, *Therapeutic Immunology*, 1, 3-15. La solicitud de patente internacional WO 2005077981 describe anticuerpos en los que cada cadena comprende dos dominios Fc, a saber, cada cadena de anticuerpo comprende en secuencia lineal CH2 CH3 CH2 CH3 y estos dominios están dimerizados para formar dos dominios Fc funcionales para proporcionar mejores funciones efectoras. La solicitud de patente internacional WO 2005017148 y Hayden *et al.*, véase más arriba, describen polipéptidos monocatenarios que comprenden un Fv monocatenario fusionado a la mitad de un dominio Fc, a saber, sc-Fv-CH2 CH3. Estos polipéptidos pueden existir como monómeros y como dímeros.

Aunque la especificidad de fijación de los anticuerpos ha hecho que estos sean agentes terapéuticos útiles, las moléculas bivalentes, tales como los anticuerpos, son a menudo agentes inapropiados de acción selectiva contra determinados antígenos de la superficie celular. La fijación bivalente puede hacer que la célula diana sufra coestimulación, activación y/o modulación antigénica, con lo que se ofrece a la célula un medio para eludir el complemento y las diferentes células efectoras que se reclutan mediante el dominio Fc del anticuerpo. En su lugar, para actuar selectivamente sobre tales células, los anticuerpos contra antígenos de la superficie se han conjugado típicamente a fármacos o toxinas que matan las células tras su internalización.

En cambio, los fragmentos de anticuerpo monovalentes no producen modulación antigénica, ya que no se produce la redistribución del antígeno de superficie y, por tanto, no hay coestimulación ni internalización. Sería deseable, por lo tanto, conservar las funciones efectoras naturales de un anticuerpo en tales fragmentos y, así pues, evitar la costosa y laboriosa necesidad de conjugarles fármacos o toxinas. Un ejemplo de tal fragmento de anticuerpo se produjo mediante la escisión proteolítica de una IgG de conejo descrita por Glennie y Stevenson, 1982, *Nature*, 295, 712-713. El fragmento comprendía un único sitio de fijación de Fab, pero conservaba el dominio Fc entero. El fragmento se produjo mediante la digestión con papaína de una variante alotípica de IgG del anticuerpo A12 de conejo que está glucosilada en una cadena, lo que hace que esa cadena sea resistente a la digestión de la papaína, lo que permite la retención de uno de los brazos de Fab. El fragmento producido se demostró que era más eficaz que la IgG entera a la hora de activar la lisis de las células mediada por el complemento. Se han producido fragmentos parecidos de la IgG de humano mediante digestión proteolítica (Michaelsen y Natvig, *Scand. J. Immunology*, 1973, 2, 299-312; Michaelsen y Natvig, *Scand. J. Immunology*, 1972, 1, 255-268) y mediante escisión química (Wines y Easterbrook-Smith, *Molecular Immunology*, 1991, 28, 8, 855-863). No resulta práctico producir estos fragmentos a escala comercial, ya que el uso de la proteólisis requiere que el tiempo de preparación sea largo y da lugar a un rendimiento bajo y una mezcla de productos.

La solicitud de patente internacional WO 2005001025 describe proteínas híbridas que comprenden dos cadenas polipeptídicas, en donde la primera cadena polipeptídica comprende una región Fc y una molécula biológicamente activa, y la segunda cadena polipeptídica comprende una región Fc sin la molécula biológicamente activa de la primera cadena. Las dos cadenas se producen por separado y se dejan dimerizar o bien se conjugan químicamente entre sí. Aunque esto produce la molécula funcional deseada, la preparación es compleja e implica procedimientos cromatográficos de poco rendimiento.

Sorprendentemente, ahora hemos encontrado que es posible producir un dominio Fc funcional como un polipéptido

monocatenario. Los polipéptidos de la presente invención por lo tanto tienen la ventaja de que se pueden producir de manera recombinante en grandes cantidades y que se pueden unir mediante cualquier medio idóneo a cualquier otra molécula, tal como un dominio de fijación. Además, como los dominios constantes de anticuerpo forman un dominio Fc dentro de la cadena, los polipéptidos de la presente invención no son propensos a la dimerización y, así pues, cuando se desea, se pueden evitar los dominios de fijación bivalentes.

De acuerdo con esto, la presente memoria proporciona un polipéptido Fc monocatenario en donde la secuencia N- a C- terminal es:

un primer dominio CH2 unido vía su extremo carbonilo al extremo amino de un primer dominio CH3, y

dicho primer dominio CH3 está unido por su extremo carbonilo vía un conector de longitud aminoacídica que comprende repeticiones de una secuencia seleccionada de GS, GSGGS, GGGGS y GGGGS al extremo amino del segundo dominio CH2 que está conectado por su extremo carbonilo al extremo amino del segundo dominio CH3,

en donde los dominios Fc, en dicho polipéptido Fc monocatenario consisten en dos dominios CH2 y dos dominios CH3 caracterizados por formar dichos dominios CH2 y CH3 un dominio Fc funcional dentro de la cadena polipeptídica, en la que está dimerizado un primer dominio CH2 con un segundo dominio CH2 y un primer dominio CH3 está dimerizado con un segundo dominio CH3 dentro de la cadena polipeptídica, y

conectado al extremo amino de un primer dominio CH2 de dicho polipéptido Fc monocatenario, está una molécula biológicamente activa que es una proteína de unión monovalente seleccionada del grupo que consiste en: scFv, Fab, Fab', V_{HH}, Fv, V_K, VH y VL. De acuerdo con esto, en el polipéptido monocatenario de la presente invención un primer dominio CH2 está dimerizado con un segundo dominio CH2 y un primer dominio CH3 está dimerizado con un segundo dominio CH3 dentro de la cadena polipeptídica.

El término «funcional», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la capacidad que el dominio Fc formado dentro del polipéptido monocatenario tiene para proporcionar una o varias funciones efectoras normalmente asociadas a los dominios Fc, aunque se apreciará que se pueden crear por ingeniería genética otras funciones en tales dominios. Los ejemplos de funciones efectoras incluyen determinar la semivida y/o distribución del polipéptido Fc por el cuerpo, la capacidad del polipéptido Fc para fijarse al complemento y la capacidad del polipéptido Fc para fijarse a los receptores de Fc de la superficie celular. Los ejemplos de tales funciones efectoras incluyen, pero sin limitarse a ellos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (FCDA) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

El dominio Fc de la presente invención comprende cuatro o más dominios constantes que pueden proceder de cualquier especie y/o clase de anticuerpo idóneos. Preferiblemente, los dominios constantes son de humano. En los humanos hay cinco clases o isotipos diferentes de anticuerpos, que incluyen IgA (que incluye IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4) e IgM. Cada dominio Fc idóneo se puede utilizar en función las funciones efectoras necesarias. Típicamente, la terminología dominio Fc, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG (CH2 y CH3) y los últimos tres dominios de la región constante de IgE y IgM (CH2, CH3 y CH4), aunque se apreciará que en determinadas circunstancias no todos los dominios podrían resultar necesarios, por ejemplo, en el caso de IgE o IgM, bastaría tan solo con los dominios CH2 y CH3. También se apreciará que se puede formar más de un dominio Fc dentro del polipéptido Fc monocatenario y que estos dominios Fc pueden proceder de los mismos o diferentes isotipos.

Los restos de los dominios de anticuerpo se numeran convencionalmente según un sistema diseñado por Kabat et al. Este sistema se presenta en Kabat et al., 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE. UU., NIH, EE. UU. (a partir de ahora, «Kabat et al. (véase más arriba)»). En la presente especificación se usa dicho sistema de numeración, a menos que se indique lo contrario.

En una realización, el dominio Fc procede de IgA y el polipéptido Fc monocatenario comprende dos dominios Cα2 y dos dominios Cα3.

En una realización, el dominio Fc procede de IgD y el polipéptido Fc monocatenario comprende dos dominios Cδ2 y dos dominios Cδ3.

Preferiblemente, el dominio Fc de la presente invención procede de una IgG y el polipéptido Fc monocatenario comprende dos dominios Cγ2 y dos dominios Cγ3. Las secuencias preferidas para el dominio Cγ2 de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 para ser usadas en la presente invención se proporcionan en las SEQ ID n.^{os} 2, 15, 28 y 41, respectivamente, y las secuencias preferidas para el dominio Cγ3 de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 para ser usadas en la invención se proporcionan en las SEQ ID n.^{os} 3, 16, 29 y 42, respectivamente.

De acuerdo con esto, en una realización de la presente invención se proporciona un polipéptido monocatenario que comprende dos dominios Cγ2 y dos dominios Cγ3, caracterizados por formar dichos dominios Cγ2 y Cγ3 un dominio Fc funcional dentro de la cadena, a saber, un primer dominio Cγ2 está dimerizado con un segundo dominio Cγ2, y un primer dominio Cγ3 está dimerizado con un segundo dominio Cγ3 dentro de la cadena polipeptídica.

Se apreciará que los dominios de la región constante para ser usados en la producción del dominio Fc de la presente invención pueden incluir variantes de los dominios constantes que se producen de forma natural descritos más arriba en la presente memoria. Tales variantes pueden comprender una o varias variaciones aminoacídicas en comparación con los dominios constantes de tipo silvestre. En un ejemplo, el dominio Fc de la presente invención comprende al menos un dominio constante cuya secuencia varía respecto al dominio constante del tipo silvestre. Se apreciará que los dominios constantes variantes pueden ser más largos o más cortos que el dominio constante del tipo silvestre. Preferiblemente, las variantes de los dominios constantes son idénticas o parecidas a al menos el 50% a un dominio constante del tipo silvestre. El término «identidad», tal y como se usa en la presente memoria, indica que en cualquier posición concreta de las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias. El término «similitud», tal y como se usa en la presente memoria, indica que, en cualquier posición concreta de las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo parecido entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina se puede sustituir por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que se pueden sustituir a menudo entre sí incluyen, pero sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amidadas); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud se pueden calcular con facilidad (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing. Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). En un ejemplo, las variantes de los dominios constantes son idénticas o parecidas a al menos el 60% a un dominio constante del tipo silvestre. En otro ejemplo, las variantes de los dominios constantes son idénticas o parecidas a al menos el 70%. En otro ejemplo, las variantes de los dominios constantes son idénticas o parecidas a al menos el 80%. En otro ejemplo, las variantes de los dominios constantes son idénticas o parecidas a al menos el 90%. En otro ejemplo, las variantes de los dominios constantes son idénticas o parecidas a al menos el 95%.

En una realización, las variantes de los dominios constantes proporcionan funciones efectoras para Fc equivalentes a las del dominio Fc de tipo silvestre. En una realización, las variantes de los dominios constantes proporcionan mejoras de las funciones efectoras. En una realización, las variantes de los dominios constantes proporcionan alteraciones de las funciones efectoras. En un ejemplo, el dominio Fc no proporciona ninguna función efectora que no sea la extensión de la semivida. En un ejemplo, el dominio Fc proporciona la fijación al FcR, pero no la fijación al C1q. En un ejemplo, el dominio Fc proporciona la fijación al C1q, pero no la fijación al FcR.

Se conocen en la técnica numerosas variantes de polipéptidos Fc, véase, por ejemplo, Idusogie et al., *Journal of Immunology*, 2000, 164, 4178-4184 y Shields et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, 9, 6591-6604. Una lista exhaustiva de las variantes de Fc se proporciona en la solicitud de patente internacional WO 2005077981 (véase en concreto el párrafo número 80).

Ejemplos de Fc variantes incluyen en la IgG1 N314Q (o N297Q), T318A (T299A), A349S (A330S) con P350A (P331A), L247A (L234A) con L248A (L235A) o P348A (P329A) (el número entre paréntesis es la numeración de la UE). Cuando se utiliza el dominio Fc de IgG4, se puede utilizar la mutación S241P (S228P) (Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108). Se apreciará que se puede producir y analizar cualquier variante idónea mediante el uso de los métodos convencionales conocidos en la técnica.

Los dominios CH2, CH3 y, cuando está presente, CH4 del polipéptido Fc monocatenario de la presente invención están unidos en la cadena polipeptídica monocatenaria, de tal manera que pueden formar todavía un dominio Fc funcional dentro de la cadena. De acuerdo con esto, se puede utilizar cualquier conector aminoacídico idóneo para unir estos dominios constantes siempre y cuando permitan formar un dominio Fc funcional dentro del polipéptido monocatenario. Los aminoácidos idóneos para ser usados en los conectores de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, aminoácidos flexibles y pequeños, tales como Gly, Ser, Ala y Thr. En una realización, el conector comprende o consiste en restos de glicina. En una realización, el conector comprende o consiste en restos de serina. En una realización, el conector comprende o consiste en restos de alanina. En una realización, el conector comprende o consiste en restos de treonina. En una realización, el conector comprende o consiste en restos de glicina y serina. En una realización, el conector comprende o consiste en restos de glicina, serina y alanina. En una realización, el conector comprende o consiste en restos de glicina, serina, alanina y treonina. Para que no quepan dudas, se debe saber que están incluidas todas las permutaciones de restos glicina y/o serina y/o alanina y/o treonina. En un ejemplo, el conector comprende o consiste en del 30 al 80% de restos de glicina y del 20 al 70% de restos de serina. En un ejemplo, el conector comprende o consiste en del 35 al 50% de restos de glicina; del 30 al

40% de restos de serina; del 5 al 15% de restos de treonina y del 10 al 20% de restos de alanina. En un ejemplo, los restos aminoacídicos se distribuyen al azar dentro del conector. Los ejemplos específicos de conectores idóneos incluyen polímeros de glicina y serina que comprenden, por ejemplo, repeticiones de secuencias, tales como GS, GSGGS, GGGGS y GGGGS.

- 5 En una realización, el dominio del polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende dos dominios CH2 y dos dominios CH3.

10 En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido Fc monocatenario que comprende dos dominios CH2 y dos dominios CH3, en donde en secuencia desde el extremo amino al extremo carboxilo, un primer dominio CH2 está unido por su extremo carboxilo al extremo amino de un primer dominio CH3 y dicho primer dominio CH3 está unido por su extremo carboxilo mediante un conector al extremo amino de un segundo dominio CH2 que está unido por su extremo carboxilo al extremo amino de un segundo dominio CH3 (como se muestra en la figura 1).

En una realización, el primer dominio CH2 está directamente unido, esto es, genéticamente fusionado, por su extremo carboxilo al extremo amino del primer dominio CH3.

- 15 En una realización, el segundo dominio CH2 está directamente unido, esto es, genéticamente fusionado, por su extremo carboxilo al extremo amino del segundo dominio CH3.

Ejemplos de dominios CH2 idóneos genéticamente fusionados al dominio o dominios CH3 se ofrecen en las SEQ ID n.^{os} 5, 18, 31 y 44.

20 En una realización, se usa un conector para unir el extremo carboxilo del primer dominio CH2 al extremo amino del primer dominio CH3.

En una realización, se usa un conector para unir el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 al extremo amino del segundo dominio CH3.

25 Cuando un conector se utiliza para unir (i) el extremo carboxilo del primer dominio CH2 al extremo amino del primer dominio CH3 y/o (ii) el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 al extremo amino del segundo dominio CH3, el conector tendrá suficiente longitud para permitir que se forme un dominio Fc funcional dentro de la cadena. Típicamente, el conector tendrá sólo unos pocos aminoácidos de longitud, preferiblemente menos de 10 aminoácidos de longitud. Cuando un conector se utiliza en (i) y en (ii), más arriba, los dos conectores pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, los conectores tendrán aproximadamente la misma longitud.

30 El conector utilizado para unir el extremo carboxilo del primer dominio CH3 al extremo amino del segundo dominio CH2 será lo suficientemente largo para permitir que se forme un dominio Fc funcional dentro de la cadena, a saber, será suficientemente largo para permitir que un primer dominio CH2 esté dimerizado con un segundo dominio CH2, y que un primer dominio CH3 esté dimerizado con un segundo dominio CH3 dentro de la cadena polipeptídica. En una realización, el conector tiene aproximadamente de 30 a 100 aminoácidos de longitud, en otra realización, el conector tiene aproximadamente de 40 a 100 aminoácidos de longitud. En una realización, el conector tiene aproximadamente de 40 a 90 aminoácidos de longitud. En una realización, el conector tiene aproximadamente de 40 a 80 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 40 a 70 aminoácidos de longitud. Los aminoácidos idóneos para ser usados en estos conectores están descritos más arriba en la presente memoria. En un ejemplo, el conector comprende o consiste en del 35 al 50% de restos de glicina; del 30 al 40% de restos de serina; del 5 al 15% de restos de treonina y del 10 al 20% de restos de alanina. En un ejemplo, los restos aminoacídicos se distribuyen al azar dentro del conector. Un ejemplo de un conector idóneo se proporciona en la SEQ ID n.^o 62. En una realización, el conector puede comprender, preferiblemente, hacia su extremo carboxilo, uno o varios restos de cisteína. En una realización, el conector puede comprender en su extremo carboxilo la secuencia de toda o parte de la región bisagra de un anticuerpo o variante de la misma, que comprende uno o varios restos de cisteína. Ejemplos de secuencias bisagra idóneas para ser usadas en los conectores de la presente invención se proporcionan en la patente de los Estados Unidos US 5.677.425, y en las solicitudes de patente internacional WO 9915549, WO 9825971 y WO 2005003171. Otros ejemplos de bisagras idóneas se proporcionan en las SEQ ID n.^{os} 53 a 57. De acuerdo con esto, en un ejemplo, el conector de la SEQ ID n.^o 62 comprende además en su extremo carboxilo cualquiera de las secuencias dadas a conocer en las SEQ ID n.^{os} 53 a 57. En esta realización, el conector tiene aproximadamente de 30 a 130 aminoácidos de longitud. En una realización, el conector tiene aproximadamente de 50 a 100 aminoácidos de longitud.

En una realización, el conector tiene aproximadamente de 50 a 80 aminoácidos de longitud.

En un ejemplo, uno o ambos conectores comprende o consiste en del 50 al 80% de restos de glicina y del 10 al 30% de restos de serina. En un ejemplo, los restos aminoacídicos se distribuyen al azar dentro del conector. En un ejemplo, el conector comprende la secuencia (GGGGS)_n, en donde n = 3 a 8.

- 55 En una realización, uno o varios de los siguientes dominios están directamente unidos, a saber, genéticamente fusionados (i) el extremo carboxilo del primer dominio CH2 al extremo amino del primer dominio CH3 y (ii) el extremo

carboxilo del segundo dominio CH2 al extremo amino del segundo dominio CH3.

En una realización, uno o varios de los siguientes dominios están conectados por un conector (iii) el extremo carboxilo del primer dominio CH2 al extremo amino del primer dominio CH3, y (iv) el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 al extremo amino del segundo dominio CH3.

- 5 Cuando un conector está presente entre cualquiera de (iii o iv), este conector tendrá una longitud suficiente para permitir que se forme un dominio Fc funcional dentro de la cadena. Típicamente, el conector tendrá solo unos pocos aminoácidos de longitud. Cuando hay más de un conector, se apreciará que estos pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, los conectores tendrán aproximadamente la misma longitud.

- 10 En una realización, uno o varios de los siguientes dominios están directamente unidos, a saber, genéticamente fusionados (i) el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 al extremo amino del primer dominio CH3.

En una realización, uno o varios de los siguientes dominios están conectados mediante un conector (i) el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 al extremo amino del primer dominio.

- 15 Cuando un conector está presente el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 y el extremo amino del primer dominio CH3, el conector tendrá una longitud suficiente para permitir que se forme un dominio Fc funcional dentro de la cadena. Típicamente, el conector tendrá solo unos pocos aminoácidos de longitud. Cuando hay más de un conector, se apreciará que estos pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, los conectores tendrán aproximadamente la misma longitud.

- 20 En una realización, el conector comprende todo o parte de una secuencia bisagra de anticuerpo o una variante de la misma, tal y como está descrito más arriba en la presente memoria, que puede comprender uno o varios restos de cisteína. Las secuencias bisagra idóneas incluyen las dadas a conocer en las SEQ ID n.^{os} 53 a 57.

En una realización, uno o varios de los siguientes dominios están directamente unidos, a saber, genéticamente fusionados (i) el extremo carboxilo del primer dominio CH2 y el extremo amino del primer dominio CH3 (ii) el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 y el extremo amino del segundo dominio CH3 (iii) el extremo carboxilo del segundo dominio CH3 y el extremo amino del primer dominio CH4.

- 25 En una realización, uno o varios de los siguientes dominios están conectados mediante un conector (i) el extremo carboxilo del primer dominio CH2 y el extremo amino del primer dominio CH3 (ii) el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 y el extremo amino del segundo dominio CH3 (iii) el extremo carboxilo del segundo dominio CH3 y el extremo amino del primer dominio CH4.

- 30 Cuando un conector está presente entre uno o varios de (i) el extremo carboxilo del primer dominio CH2 y el extremo amino del primer dominio CH3 (ii) el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 y el extremo amino del segundo dominio CH3 (iii) el extremo carboxilo del segundo dominio CH3 y el extremo amino del primer dominio CH4, el conector tendrá una longitud suficiente para permitir que se forme un dominio Fc funcional dentro de la cadena. Típicamente, el conector tendrá unos pocos aminoácidos de longitud. Cuando hay más de un conector se apreciará que estos pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, los conectores tendrán aproximadamente la misma longitud.

El conector entre el extremo carboxilo del primer dominio CH3 y el extremo amino del segundo dominio CH2 y el conector entre el extremo carboxilo del primer dominio CH4 y el extremo amino del segundo dominio CH4 tendrá una longitud suficiente para permitir que se forme un dominio Fc funcional dentro de la cadena.

- 40 El conector entre el extremo carboxilo del primer dominio CH4 y el extremo amino del segundo dominio CH4 tiene típicamente entre 15 y 40 aminoácidos de longitud. En otra realización el conector tiene entre 20 y 35 aminoácidos de longitud. En una realización, el conector entre el extremo carboxilo del primer dominio CH4 y el extremo amino del segundo dominio CH4 comprende la secuencia (GGGGS)_n, en donde n = 5 (SEQ ID n.º 63).

- 45 El conector entre el extremo carboxilo del primer dominio CH3 y el extremo amino del segundo dominio CH2 típicamente tiene aproximadamente de 30 a 100 aminoácidos de longitud, en otra realización, el conector tiene aproximadamente de 40 a 100 aminoácidos de longitud. En una realización, el conector tiene aproximadamente de 40 a 80 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 40 a 70 aminoácidos de longitud. Un ejemplo de un conector idóneo se proporciona en la SEQ ID n.º 62.

- 50 En una realización, el conector entre el primer dominio CH3 y el segundo dominio CH2 comprende, preferiblemente, hacia su extremo carboxilo, uno o varios restos de cisteína. En una realización, este conector comprende toda o parte de una secuencia bisagra de anticuerpo o una variante de la misma, tal y como está descrito más arriba en la presente memoria, que puede comprender uno o varios restos de cisteína. Las secuencias bisagra idóneas incluyen las SEQ ID n.^{os} 53 a 57.

En una realización, el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende además un conector aminoácido genéticamente fusionado al extremo amino del primer dominio CH2. El conector puede comprender

- cualquier aminoácido idóneo y tener una longitud idónea. En una realización, el conector comprende uno o varios restos de cisteína. En una realización, el conector genéticamente fusionado al extremo amino del primer dominio CH2 comprende toda o parte de una secuencia bisagra de anticuerpo o una variante de la misma, tal y como está descrito más arriba en la presente memoria. En una realización, el conector comprende la secuencia dada en cualquiera de las SEQ ID n.^{os} 53 a 57. En una realización, uno o varios de los restos de cisteína presentes en el conector están unidos mediante disulfuro a uno o varios restos de cisteína presentes en (cuando está presente) el conector que conecta el extremo carboxilo del primer dominio CH3 y el extremo amino del segundo dominio CH2 (véase, por ejemplo, la figura 1a).
- En otra realización, el conector fusionado al extremo amino puede comprender todo o parte de la región bisagra de un anticuerpo o variante del mismo, en el que una o varias cisteínas han sido sustituidas por otro aminoácido, preferiblemente serina. Ejemplos de conectores idóneos de este tipo se proporcionan en las SEQ ID n.^{os} 58 a 61.
- Ejemplos de polipéptidos Fc monocatenarios de acuerdo con la presente invención para IgG1, 2, 3 y 4 se proporcionan en las SEQ ID n.^{os} 8-13, 21-26, 34-39 y 47-52, respectivamente. Véase también la figura 6 para los ejemplos de secuencias de IgG1. La invención también se extiende a variantes de estas secuencias, tal y como está descrito más arriba en la presente memoria. En un ejemplo, la presente invención proporciona un polipéptido Fc monocatenario que comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos el 70% con cualquiera de las secuencias dadas en las SEQ ID n.^{os} 8-13, 21-26, 34-39 y 47-52. En otro ejemplo, un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos el 80% con cualquiera de las secuencias dadas en las SEQ ID n.^{os} 8-13, 21-26, 34-39 y 47-52. En otro ejemplo, un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos el 90% con cualquiera de las secuencias dadas en las SEQ ID n.^{os} 8-13, 21-26, 34-39 y 47-52. En otro ejemplo, un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos el 95% o el 98% con cualquiera de las secuencias dadas en las SEQ ID n.^{os} 8-13, 21-26, 34-39 y 47-52.
- En una realización, el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende además un dominio CH1 fusionado facultativamente a través de una bisagra al extremo amino del primer dominio CH2. Ejemplos de dominios CH1 idóneos se proporcionan en las SEQ ID n.^{os} 1, 14, 27 y 40.
- Los polipéptidos Fc monocatenarios de la presente invención se pueden utilizar en numerosas aplicaciones, entre ellas, aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de investigación. Preferiblemente, los polipéptidos Fc monocatenarios de la presente invención comprenden además una o varias moléculas diferentes que se pueden fusionar o si no unirse al extremo amino y/o carboxilo y/o en otro lugar del polipéptido. Tales moléculas incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, glúcidos, proteínas y péptidos, entre ellos, por ejemplo, proteínas receptoras, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. El polipéptido Fc monocatenario se pueden unir a otra molécula, facultativamente a través de un conector (aminoacídico o químico), mediante cualquier medio idóneo conocido en la técnica, entre ellos, por ejemplo, la conjugación química, el entrecruzamiento químico o la fusión genética. En una realización, el polipéptido Fc monocatenario comprende un conector que contiene cisteína, tal como una bisagra de anticuerpo, en su extremo amino, y una de estas cisteínas libres se utiliza como sitio de adhesión para otra molécula, preferiblemente una molécula biológicamente activa tal y como está descrito más adelante.
- En una realización, los polipéptidos Fc monocatenarios de la presente invención se utilizan como una etiqueta Fc, por ejemplo, para ayudar a la purificación de la proteína y/o la detección de la proteína. De acuerdo con esto, en una realización, el polipéptido Fc monocatenario comprende además en su extremo amino toda o parte de otra proteína. Ventajosamente, y a diferencia de las fusiones de Fc actualmente disponibles, tales fusiones a Fc no se dimerizan, con lo que se asegura que la proteína de fusión permanece monomérica. En determinadas aplicaciones, en las que es deseable poder retirar el dominio Fc, por ejemplo, después de la purificación, el polipéptido Fc monocatenario se puede unir a otra proteína mediante un conector escindible.
- El polipéptido Fc monocatenario de la presente invención está unido por su extremo carbonilo y/o amino a una molécula biológicamente activa. En una realización, la molécula biológicamente activa pone en contacto el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención con una diana deseada, por ejemplo, una proteína diana. En una realización, la molécula biológicamente activa se fija a una proteína diana deseada. En un ejemplo, la proteína diana es una proteína asociada a una célula, por ejemplo una proteína de la superficie celular de células tales como las células bacterianas, células de levadura, linfocitos T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Las proteínas diana pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tal como las proteínas sobreexpresadas durante una enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus correspondientes ligandos. Ejemplos particulares de proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como integrinas β 1, p. ej. VLA-4, selectina E, selectina P o selectina L, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CD28, CD40L, CTLA-4, CD22, CDCP1, DPCR1, DPCR1, dudulina 2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, tipo nectina 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de la grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC de clase I y antígenos de MHC de clase II, y VEGF, y

cuando sea adecuado, receptores de los mismos.

En una realización, la proteína diana es una proteína soluble. Las proteínas solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-16 o IL-17, proteínas víricas, por ejemplo proteínas de virus respiratorio sincitial o de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor α de la necrosis tumoral, factor β de la necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α , y PDGF- β , y cuando sea apropiado los receptores de los mismos.

En una realización, los polipéptidos Fc monocatenarios de la presente invención se pueden utilizar para alterar funcionalmente la actividad de una proteína concreta a la cual se fija la molécula biológicamente activa. Por ejemplo, el polipéptido Fc monocatenario puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de una proteína. En una realización, la fijación del polipéptido Fc monocatenario a una célula a través de la molécula biológicamente activa da lugar a la muerte celular, p. ej., mediante la citotoxicidad mediada por el complemento.

La molécula biológicamente activa es una proteína de unión monovalente seleccionada del grupo que consiste en scFv, Fab, Fab', V_{HH}, Fv, V_K, VH, VL. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo idóneos incluyen los descritos en Adair y Lawson, 2005. «Therapeutic antibodies» *Drug Design Reviews - Online* 2(3): 209-217, y las solicitudes de patente internacional WO 2005003169, WO 2005003170 y WO 2005003171.

Un fragmento de anticuerpo para ser usado en la presente invención puede proceder de cualquier clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina, y puede proceder de cualquier especie, entre las que se incluyen, por ejemplo, ratón, rata, tiburón, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o humano.

En una realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo monoclonal, humanizado y/o quimérico.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que tiene una o varias regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por su nombre en inglés) de una especie no humana y una región flanqueante de una molécula de inmunoglobulina de humano que facultativamente comprende uno o varios restos donantes de la especie no humana (véase, por ejemplo, patente de los EE. UU. US 5.585.089).

Se han creado por ingeniería genética anticuerpos quiméricos para que los genes de cadena ligera y pesada estén compuestos de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Preferiblemente, las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera son de humano y las regiones variables proceden de otras especies.

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

También se pueden obtener anticuerpos mediante cualquier otro método idóneo, tales como los descritos en Babcock, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (15), 7843-7848, y las solicitudes de patente internacional WO 92/02551, WO 2004/051268 y WO 2004/106377.

Un fragmento de anticuerpo para ser usado en la presente invención se puede obtener de cualquier anticuerpo entero, en especial de un anticuerpo monoclonal entero, mediante el uso de cualquier técnica idónea de escisión y/o digestión enzimática, por ejemplo, mediante el tratamiento con pepsina. Como alternativa, los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y la reexpresión de ADN que codifica regiones constantes y/o variables de anticuerpo. Se pueden utilizar técnicas convencionales de la biología molecular para modificar, añadir o suprimir aminoácidos o dominios según se vea necesario. Cualquier alteración de las regiones variables o constantes todavía está incluida en los términos región 'variable' y 'constante' según se utilizan en la presente memoria.

Los métodos para crear y fabricar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Boss et al., patente de los EE. UU. US 4.816.397; Cabilly et al., patente de los EE. UU. US 6.331.415; Shrader et al., solicitud de patente internacional 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., patente de los EE. UU. US 5.585.089; Adair, solicitud de patente internacional WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10, 1-142; Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181).

Los fragmentos de anticuerpo para ser usados en la presente invención pueden poseer una región bisagra nativa o modificada que comprende una o varias cisteínas. La región bisagra nativa es la región bisagra asociada normalmente al 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. Tales bisagras pueden incluir regiones bisagra de otras especies, tales como regiones bisagra de humano, ratón, rata, conejo, tiburón, cerdo, hámster, camello, llama

- o cabra. Otras regiones bisagra modificadas pueden comprender una región bisagra completa procedente de un anticuerpo de una clase o subclase diferente a la del dominio C_H1. Así pues, por ejemplo, un dominio C_H1 de clase γ 1 podría estar conectado a una región bisagra de clase γ 4. Como alternativa, la región bisagra modificada puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad de repetición en la que cada unidad de la repetición procede de una región bisagra natural. En una alternativa más, se puede alterar la región bisagra natural al convertir una o varias cisteínas u otros restos en restos neutros, tales como serina o alanina, o al convertir los restos colocados idóneamente en restos de cisteína. Mediante tales medios, se puede incrementar o disminuir el número de restos de cisteína de la región bisagra. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser totalmente sintéticas o se pueden diseñar para que posean propiedades deseadas, tales como longitud, composición de cisteínas y flexibilidad.
- 5
- 10 Ya se han descrito numerosas regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. US 5.677.425, y en las solicitudes de patente internacional WO 9915549, WO 9825971 y WO 2005003171. En un ejemplo, la proteína para ser usada en la presente invención es un fragmento Fab' con una región bisagra nativa o modificada.
- 15 En un ejemplo, se pueden manipular genéticamente una o varias cisteínas en los fragmentos de anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, para crear una o varias cisteínas expuestas en la superficie (patente de los EE. UU. US 5.219.996). Así pues, mediante el uso de técnicas de ingeniería idóneas, el número de cisteínas de un fragmento de anticuerpo se puede modificar para proporcionar un número específico de sitios, por ejemplo, para la adhesión de moléculas efectoras.
- 20 En una realización, el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende además un fragmento de anticuerpo.
- En una realización, el fragmento de anticuerpo es un polipéptido Fv monocatenario. En una realización, el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende además un polipéptido Fv monocatenario. En una realización, el extremo carboxilo del dominio VH del sc-Fv está fusionado genéticamente al extremo amino del primer dominio CH2, facultativamente mediante uno de los conectores descritos más arriba en la presente memoria.
- 25 En una realización, el extremo carboxilo del dominio VH del sc-Fv está fusionado genéticamente al extremo amino del primer dominio CH2, facultativamente mediante uno de los conectores descritos más arriba en la presente memoria.
- En una realización, la molécula biológicamente activa es un Fab o Fab' (véase, por ejemplo, la figura 1). En una realización, el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención comprende además un fragmento Fab o Fab' de anticuerpo. En una realización, el extremo carboxilo de la cadena VH-CH1 del Fab o Fab' está genéticamente fusionado al extremo amino de un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención. En esta realización, la cadena VL-CL del Fab o Fab' está unida a la cadena VH-CH1 mediante un enlace disulfuro, preferiblemente el enlace disulfuro intercatenario nativo. En una realización, el extremo carboxilo de la cadena VL-CL del Fab o Fab' está genéticamente fusionado al extremo amino de un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención. En esta realización, la cadena VH-CH1 del Fab o Fab' está unida a la VL-CL mediante un enlace disulfuro, preferiblemente el enlace disulfuro intercatenario nativo.
- 30
- 35 El polipéptido Fc monocatenario de la presente invención puede llevar unidas una o varias moléculas efectoras. Las moléculas efectoras se pueden unir mediante cualquier método idóneo, por ejemplo, mediante conjugación química o fusión genética.
- 40 La terminología «molécula efectora», según se utiliza en la presente memoria, incluye, por ejemplo, antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas, p. ej. ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, concretamente yodo radiactivo,
- 45 radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar por RMN o espectroscopia ESR. Se apreciará que una molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o varias de dichas moléculas unidas de tal modo que forman un único grupo funcional que puede unirse a una proteína mediante el procedimiento de la presente invención.
- 50 Los agentes antineoplásicos concretos incluyen agentes citotóxicos o citostáticos, por ejemplo alquilantes, tales como clormetinas (p. ej. clorambucilo, melfalán, mecloretamina, ciclosfosfamida, o mostaza de uracilo) y derivados de los mismos, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, busulfano, o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoroacético, o ácido fluorocítrico, antibióticos, tales como bleomicinas (p. ej. sulfato de bleomicina), doxorubicina, daunorubicina, mitomicinas (p. ej. mitomicina C), actinomicinas (p. ej. dactinomicina), plicamina, caliqueamicina y derivados de los mismos, o esperamicina y derivados de la misma; inhibidores mitóticos, tales como etopósido, vincristina o vinblastina, y derivados de los mismos; alcaloides tales como elipticina; polioles tales como taxicina I o taxicina II; hormonas, tales como andrógenos (p. ej. dromostanolona o testolactona), progestinas (p. ej. acetato de megestrol o acetato de medroxiprogesterona), estrógenos (p. ej. difosfato de dimetilestilbestrol, fosfato de poliestradiol o fosfato de estramustina) o antiestrógenos (p. ej. tamoxifeno); antraquinonas, tales como mitoxantrona, ureas, tales como
- 55

hidroxiurea; hidrazinas, tales como procarbazona; o imidazoles, tales como dacarbazina.

Los metales quelados incluyen quelatos de metales di- o triplos que tienen un número de coordinación de 2 a 8 inclusive. Los ejemplos concretos de tales metales incluyen tecnecio (Tc), renio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), itrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd), y escandio (Sc).

- 5 En general, el metal es preferiblemente un radionúclido. Los radionúclidos concretos incluyen ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{67}Cu , ^{195}Au , ^{199}Au , ^{110}Ag , ^{203}Pb , ^{206}Bi , ^{207}Bi , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{160}Tb , ^{153}Gd y ^{47}Sc .

El metal quelado puede ser, por ejemplo, uno de los tipos anteriores de metales quelados con cualquier agente quelante polidentado idóneo, por ejemplo poliaminas acíclicas o cíclicas, poliéteres, (p. ej. éteres corona y derivados de los mismos); poliamidas; porfirinas; y derivados carbocíclicos.

- 10 En general, el tipo de quelante dependerá del metal en uso. Un grupo particularmente útil de quelantes en los productos conjugados de acuerdo con la invención, sin embargo, son las poliaminas acíclicas y cíclicas, en especial los ácidos poliaminocarboxílicos, por ejemplo ácido dietilentriaminopentaacético y los derivados del mismo, y las aminas macrocíclicas, p. ej. derivados cíclicos triazoicos y tetraazoicos (por ejemplo, tal y como está descrito en la Memoria de Patente Internacional Núm. WO 92/22583); y las poliamidas, en especial desferrioxamina y los derivados de la misma.

- 15 Otras moléculas efectoras incluyen otras proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, aunque sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, aunque sin limitación, inmunoglobulinas, albúmina, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria, una proteína tal como la insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno de tejido, un agente trombótico o un antiangiogénico, p. ej., angioestatina o endoestatina, o un modificador de la respuesta biológica, tal como una linfocina, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento.

- 25 Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, para el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diferentes enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en la tomografía de emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.741.900 para los iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas idóneas incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, o la acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos idóneos incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes idóneos incluyen umbeliferona, fluoresceína, rojo rodamina, verde rodamina, ficoeritrina B, ficoeritrina R, alofocianina, rojo Texas, azul Pacific, azul Marina, verde Oregon y Alexa Fluor series 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700 y 750; los materiales luminiscentes idóneos incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes idóneos incluyen luciferasa, luciferina y ecurina; y los núclidos radiactivos idóneos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

- 30 Los polímeros naturales o sintéticos para su uso como moléculas efectoras incluyen, por ejemplo, polímeros de polialquileno, polialquilenilo, o polioxilquileno de cadena lineal o ramificada facultativamente sustituidos, o polisacáridos ramificados o sin ramificar, p. ej. un homo- o heteropolisacáridos, tales como lactosa, amilosa, dextrano, almidón o glucógeno. Los sustituyentes facultativos concretos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados más arriba incluyen uno o varios grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada facultativamente sustituidos o derivados de los mismos, en especial poli(etilenglicol) facultativamente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o los derivados del mismo.

- 35 Se pretende que «derivados», tal y como se utiliza en la presente memoria, incluya los derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol tales como un ácido o éster α -halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o disulfuro maleimidado y similares. El grupo reactivo puede estar unido al polímero directamente o a través de un segmento conector. Se apreciará que el resto de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto, como grupo de unión entre la proteína y el polímero.

- 40 Se apreciará que uno o varios dominios o moléculas biológicamente activas diferentes se pueden fusionar genéticamente, o si no conjugar, al extremo carboxilo del polipéptido monocatenario.

- 45 En una realización, el polipéptido Fc monocatenario comprende además un dominio transmembranario fusionado al extremo carboxilo del polipéptido Fc monocatenario. El dominio transmembranario permite que los polipéptidos Fc monocatenarios se expresen en la superficie de una célula. De acuerdo con esto, los dominios transmembranarios adecuados se pueden utilizar en función del tipo de célula de interés. Se han descrito numerosos dominios transmembranarios diferentes, véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional WO 97/23613, WO 99/00494, WO 99/57268, WO 00/63374 y WO 00/63373. Otros ejemplos de dominios transmembranarios idóneos incluyen los dominios transmembranarios naturales con los cuales se expresan las inmunoglobulinas sobre la

- superficie de los linfocitos B, véanse por ejemplo las secuencias dadas en las SEQ ID n.^{os} 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83 y 86. En una realización, los dominios transmembranarios están unidos al extremo carboxilo del polipéptido Fc monocatenario a través de un conector. En una realización, este es el conector natural con el que las inmunoglobulinas se expresan en la superficie de los linfocitos B, véanse, por ejemplo, las secuencias dadas en las SEQ ID n.^{os} 64, 67, 70, 73, 76, 79, 82 y 85.
- En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido Fc monocatenario que comprende además un dominio transmembranario y uno o varios dominios de señalización. En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido Fc monocatenario que comprende además un dominio transmembranario fusionado al extremo carboxilo, facultativamente a través de un conector, que a su vez está fusionado por su extremo carboxilo a uno o varios dominios de señalización. Los dominios de señalización idóneos se conocen bien en la técnica y los dominios transmembranarios y de señalización idóneos se pueden elegir para obtener la expresión y/o señalización deseada en la célula en la que se expresa el Fc monocatenario.
- En un ejemplo, los dominios intracelulares son los dominios intracelulares naturales con los cuales se expresan las inmunoglobulinas sobre la superficie de los linfocitos B, véanse por ejemplo las secuencias dadas en las SEQ ID n.^{os} 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84 y 87.
- Los ejemplos de dominios de señalización idóneos también están descritos en las solicitudes de patente internacional WO 97/23613, WO 99/00494, WO 99/57268, WO 00/63372 WO 00/63374, WO 00/63373, WO 01/32709, WO 01/32866, WO 01/32867, WO 02/33101 y WO 2004/039840.
- En una realización, cuando el polipéptido Fc monocatenario también comprende fusionada a su extremo amino una molécula biológica como está descrito más arriba en la presente memoria, el polipéptido Fc monocatenario se puede utilizar como una proteína receptora quimérica. Tales polipéptidos monocatenarios de Fc tienen la propiedad ventajosa de que no dimerizan sobre la superficie de la célula y, de acuerdo con esto, impiden la señalización inapropiada en ausencia del ligando fijado.
- La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica cualquiera de los polipéptidos monocatenarios de Fc de la presente invención. Las secuencias de ADN de la presente invención pueden comprender ADN sintético, por ejemplo producido mediante procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.
- Las secuencias de ADN que codifican un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención se pueden obtener mediante los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican una parte o la totalidad de los dominios Fc de anticuerpo se pueden sintetizar como se desee a partir de determinadas secuencias de ADN o basándose en las correspondientes secuencias aminoacídicas. El ADN que codifica los dominios constantes Fc de anticuerpo está ampliamente disponible para los expertos en la técnica, y se puede sintetizar con facilidad sobre la base de sus secuencias de aminoácidos conocidas.
- Las técnicas estándares de la biología molecular se pueden utilizar para preparar secuencias de ADN que codifican el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden sintetizarse completa o parcialmente mediante el uso de técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden usar técnicas de mutagénesis específica de sitio y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su nombre en inglés), según sea apropiado.
- La presente invención también se refiere a un vector de clonación o de expresión que comprende una o varias secuencias de ADN de la presente invención. De acuerdo con esto, se proporciona un vector de expresión o de clonación que comprende una o varias secuencias de ADN que codifican un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención. En una realización, el vector de clonación o de expresión comprende una secuencia de ADN única, que codifica todo el polipéptido Fc monocatenario y facultativamente toda o parte de la molécula biológicamente activa, p. ej., un scFv o V_{HH}. En otra realización, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, en donde, por ejemplo, la primera secuencia de ADN codifica el polipéptido Fc monocatenario y una cadena de la molécula biológicamente activa, p. ej., VH-CH1, y la segunda secuencia de ADN codifica una segunda cadena del dominio de la molécula biológicamente activa, p. ej., VL-CL. Preferiblemente, un vector según la presente invención comprende una secuencia líder apropiada, tal como una secuencia líder de anticuerpo.
- Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los especialistas 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 al manual de Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.
- También se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o varios vectores de clonación o expresión que comprenden una o varias secuencias de ADN que codifican un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención. Se puede utilizar cualquier sistema idóneo de célula hospedadora/vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención. Se pueden usar bacterias, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o también se pueden usar sistemas de expresión en

células hospedadoras eucarióticas, por ejemplo de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero idóneas incluyen NSO, CHO, mieloma o hibridoma.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención que comprende una célula hospedadora que contiene un vector de la presente invención, en las condiciones idóneas que conducen a la expresión de la proteína a partir del ADN que codifica el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención, y al aislamiento del polipéptido Fc monocatenario.

10 El polipéptido Fc monocatenario puede comprender solo una única cadena y, cuando se expresa sola o como una fusión genética con la molécula biológicamente activa, sólo se necesita utilizar una única secuencia que codifica un polipéptido para transfectar las células hospedadoras, por ejemplo, scFvscFc. Para la producción de polipéptidos Fc monocatenarios que comprenden una molécula biológicamente activa que comprende dos o más cadenas, la línea celular se puede transfectar con dos o más vectores, en donde un primer vector codifica el polipéptido Fc monocatenario fusionado a una primera cadena de la molécula biológicamente activa (p. ej., VH-CH1), y un segundo vector codifica una segunda cadena de la molécula biológicamente activa (p. ej., VL-CL). Como alternativa, se puede utilizar un único vector, en donde el vector incluye la secuencia que codifica ambas cadenas de la molécula biológicamente activa, en donde una de las cadenas está fusionada al polipéptido Fc monocatenario.

15 Una vez producido, el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención se puede purificar cuando sea necesario mediante cualquier método idóneo conocido en la técnica, que incluye, por ejemplo, técnicas de cromatografía tales como el intercambio iónico, exclusión por tamaños, cromatografía de interacción hidrófoba o de proteína A.

20 El tamaño del polipéptido Fc monocatenario se puede confirmar mediante los métodos convencionales conocidos en la técnica, tales como la cromatografía de exclusión por tamaños y el SDS-PAGE no reductor. Tales técnicas se pueden utilizar para confirmar que el scFc no se ha dimerizado. Si se detectan dímeros, entonces los polipéptidos Fc monocatenarios monoméricos se pueden purificar para separarlos de las especies dimericas mediante las técnicas de cromatografía convencionales, tal y como está descrito más arriba.

25 La funcionalidad de los polipéptidos Fc monocatenarios de la presente invención se puede determinar mediante el uso de cualquier método idóneo conocido en la técnica según las funciones efectoras necesarias, que incluye los métodos dados a conocer en los ejemplos. Los ensayos idóneos incluyen ensayos de fijación del receptor de Fc, ensayos de fijación al complemento, ensayos de coestimulación, ensayos de muerte celular, ensayos de citotoxicidad y ensayos citostáticos. Además, se puede medir la semivida mediante los métodos farmacocinéticos idóneos conocidos en la técnica.

30 Además, cuando la molécula biológicamente activa se fija a una proteína de la superficie y envía selectivamente el polipéptido Fc monocatenario hacia esta proteína expresada de la superficie, también se pueden utilizar otros ensayos funcionales, tales como los ensayos de muerte celular (p. ej., ensayos de citotoxicidad mediados por el complemento). De acuerdo con esto, un experto en la técnica puede establecer con facilidad los ensayos funcionales idóneos con los que determinar si se consigue la función deseada.

35 Los polipéptidos Fc monocatenarios de la presente invención son útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades. De acuerdo con esto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende un polipéptido Fc monocatenario de la presente invención en combinación con uno o varios de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con esto, se proporciona el uso de un polipéptido Fc monocatenario de la invención para la fabricación de un medicamento. Habitualmente, la composición se suministrará como parte de una composición farmacéutica esterilizada que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

40 La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico o de reactivos para investigación que comprende añadir y mezclar el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención con uno o varios excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

El polipéptido Fc monocatenario puede ser el único ingrediente activo de la composición farmacéutica o diagnóstica, o puede venir acompañado con otros ingredientes activos, que incluyen, por ejemplo, otros ingredientes de anticuerpo o no anticuerpo, entre ellos, por ejemplo, antiinflamatorios y quimioterápicos.

45 Las composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido Fc monocatenario de la presente invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, aliviar o impedir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier polipéptido Fc monocatenario, la cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos de animales, habitualmente de roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo de animal también se puede usar para determinar el margen de concentraciones apropiado y la vía de administración apropiada. A continuación, dicha información puede usarse para determinar las dosis y vías que tengan éxito para administración en los humanos.

- La cantidad terapéuticamente eficaz para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, del peso y del sexo del sujeto, de la dieta, del momento y frecuencia de administración, de las politerapias farmacológicas, de la sensibilidad a las reacciones, y de la tolerancia/respuesta al tratamiento. Dicha cantidad puede determinarse mediante experimentación convencional y se encuentra dentro del criterio del médico. De forma general, una cantidad terapéuticamente eficaz estará entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, preferiblemente entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse por comodidad en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.
- Las composiciones pueden administrarse por separado a un paciente o pueden administrarse en combinación (p. ej., de forma simultánea, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.
- La dosis a la que se administra el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo está siendo usada de forma preventiva o para tratar una afección existente.
- La frecuencia de dosis dependerá de la semivida del polipéptido Fc monocatenario y de la duración de su efecto. Si el polipéptido Fc monocatenario tiene una semivida corta (p. ej., de 2 a 10 horas), podría ser necesario suministrar una o varias dosis al día. Como alternativa, si el polipéptido Fc monocatenario tiene una semivida larga (p. ej., de 2 a 15 días), podría ser necesario administrar tan solo una dosis una vez al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.
- El vehículo farmacéuticamente aceptable no debería inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Los vehículos idóneos pueden ser macromoléculas grandes, de metabolización lenta, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas.
- Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables de composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, en dichas composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes de pH. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, soluciones viscosas y suspensiones, para ingestión por parte del paciente.
- Las formas preferidas para administración incluyen formas idóneas para la administración parenteral, p. ej., mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, una solución o una emulsión en un vehículo oleaginoso o acuoso, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el polipéptido Fc monocatenario puede encontrarse en forma seca, para su reconstitución antes de ser usado con un líquido estéril apropiado.
- Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, es preferible que las composiciones se adapten para la administración a sujetos humanos.
- Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por una serie de vías que incluyen, aunque sin limitación, las vías oral, pulmonar, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase la solicitud de patente internacional WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hipoaerosoles y nebulizadores para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o como suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas idóneas para disolución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección.
- La administración directa de las composiciones generalmente se realizará mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento con dosis puede corresponder a una pauta de dosis única o a una pauta de dosis múltiples.
- Se apreciará que el ingrediente activo de la composición será un polipéptido Fc monocatenario. Como tal, será susceptible de degradación en el tubo digestivo. Por tanto, si la composición se va a administrar por una vía que use el tubo digestivo, la composición necesitará contener agentes que protejan el polipéptido Fc monocatenario de la degradación, pero que liberen el polipéptido Fc monocatenario una vez que se ha absorbido en el tubo digestivo.
- Se puede encontrar una explicación exhaustiva de los vehículos farmacéuticamente aceptables en *Remington's*

Pharmaceutical Sciences (Merck Publishing Company, N. J. 1991).

5 También se contempla que el polipéptido Fc monocatenario de la presente invención administre mediante el uso de la genoterapia. A fin de llevar esto a cabo, se introducen secuencias de ADN que codifican el polipéptido Fc monocatenario bajo el control de componentes de ADN apropiados en un paciente, de tal modo que el polipéptido Fc monocatenario se expresa a partir de las secuencias de ADN y se ensambla *in situ*. Como alternativa, el polipéptido Fc monocatenario se puede transfectar *ex vivo* en las células apropiadas, tales como los linfocitos T. Los ejemplos de métodos idóneos para las transfecciones *ex vivo* están descritos en la solicitud de patente internacional WO 2004/039840.

10 La presente invención también proporciona un polipéptido Fc monocatenario para ser usado en el tratamiento o la prevención de un trastorno patológico que se selecciona del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, micóticas y parasitarias), choque endotóxico asociado a una infección, artritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, enfermedad de Peyronie, enfermedad celiaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, soriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes de tipo I, artritis de Lyme, meningoencefalitis, trastornos inflamatorios mediados inmunitariamente del sistema nervioso central y periférico, tal como la esclerosis múltiple y el síndrome de Guillain-Barré, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante, cáncer (tanto tumores sólidos como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de células escamosas, cánceres de células de transición, cánceres de ovario y malignidades hematológicas, y en particular leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, cáncer gástrico y cáncer de colon), cardiopatías que incluyen enfermedades isquémicas tales como el infarto de miocardio, así como la aterosclerosis, la coagulación intravascular, la resorción ósea, la osteoporosis, la periodontitis y la hipocloridria.

20 Preferiblemente, de la presente invención proporciona un polipéptido Fc monocatenario para uso en el control de enfermedades inflamatorias y cáncer. Preferiblemente, el polipéptido Fc monocatenario se puede utilizar para reducir el proceso inflamatorio o el cáncer, o para impedir el proceso inflamatorio o el cáncer.

25 Ejemplos

La presente invención se describirá por medio de ejemplos, en los que se hace referencia a:

Figura 1 (a)-(c): Una representación esquemática de tres ejemplos de polipéptido Fc monocatenario de acuerdo con la presente invención, que comprende un fragmento Fab de anticuerpo y en el que un conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH3 y el extremo amino del segundo dominio CH2.

30 Figura 2 (a)-(c): Una representación esquemática de tres ejemplos de polipéptido Fc monocatenario que comprende un fragmento Fab de anticuerpo y en el que un conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH2 al extremo amino del segundo dominio CH2 y otro conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH3 al extremo amino del segundo dominio CH3.

35 Figura 3 (a)-(c): Una representación esquemática de tres ejemplos de polipéptido Fc monocatenario, que comprende un fragmento Fab de anticuerpo y en el que:

(a) un conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH4 al extremo amino del segundo dominio CH2.

(b) un primer conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH2 al extremo amino del segundo dominio CH2, un segundo conector une el extremo carboxilo del segundo dominio CH2 al extremo amino del primer dominio CH3 y un tercer conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH4 al extremo amino del segundo dominio CH3.

40 (c) un primer conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH3 al extremo amino del segundo dominio CH2, un segundo conector une el extremo carboxilo del segundo dominio CH3 al extremo amino del primer dominio CH4 y un tercer conector une el extremo carboxilo del primer dominio CH4 al extremo amino del segundo dominio CH4.

45 Figuras 4a y 4b: demuestran que los polipéptidos Fc monocatenarios se fijan al antígeno expresado de forma recombinante en la superficie de las células NS0 (figura 4a) y se expresan de forma natural en la superficie de los linfocitos T activados (figura 4b).

Figuras 5a y b: muestran la capacidad que los polipéptidos Fc monocatenarios tienen para inducir la citotoxicidad de las células NS0 en presencia del complemento (a), pero no en ausencia del complemento (b).

Figuras 5c y 5d: muestran la capacidad que los polipéptidos Fc monocatenarios tienen para inducir la citotoxicidad de los linfocitos T activados dependiente del complemento.

50 Figura 6: Secuencias de ejemplo de polipéptidos Fc monocatenarios procedentes de IgG1. Las secuencias bisagra están en cursiva y los conectores están subrayados.

(a) formato como el mostrado en la figura 1(a)

- (b) formato como el mostrado en la figura 1(b)
- (c) formato como el mostrado en la figura 1(c)
- (d) formato como el mostrado en la figura 2(a)
- (e) formato como el mostrado en la figura 2(b)
- 5 (f) formato como el mostrado en la figura 2(c)

Ejemplo 1:

Se diseñaron tres polipéptidos Fc monocatenarios murinos que comprenden una molécula biológicamente activa en el extremo amino, en el que la molécula biológicamente activa era un fragmento Fab de anticuerpo. Las regiones variables del fragmento Fab procedían del anticuerpo murino, Mox46, que se fija al antígeno proteico de la superficie celular. Los dominios Fc procedían de la IgG2a murina y las tres versiones diferentes de estos dominios se muestran a continuación. Las secuencias conectoras están subrayadas. Las secuencias bisagra están en cursiva y, cuando forman parte de la secuencia conectora, están en cursiva y subrayadas.

Versión 1: SEQ ID n.º 88 (formato como el ilustrado en la figura 2b). Las cisteínas de la bisagra entre CH1 y CH2 se han substituido por serinas.

*EPRGPTIKPSPPSKSPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL*MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
 WFN¹⁰NNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE
 RTISKPKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPI
 VTCVVVDVSEDDPDVQISWFN¹⁰NNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS
 GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP
 EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERN¹⁵SYSCSVVHEG
 LHNHHTTKSFSRTPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSVRAPQVYVLPPEEE
 MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEK
 KNWVERN¹⁵SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Versión 2: SEQ ID n.º 89 (formato como el ilustrado en la figura 2a).

*EPRGPTIKPC*PAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFN
 NNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISK
 PKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG*SEPRGPTIKPC*PAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL
 MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFN¹⁰NNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH
 QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCM
 VTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERN¹⁵SYSC
 SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSVRAPQVYV
 LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMY
 S
 KLRVEKKNWVERN¹⁵SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Versión 3: SEQ ID n.º 90 (formato como el ilustrado en la figura 1a). El conector comprende una bisagra trucada «PCP».

*EPRGPTIKPCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWN
NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPIERTISK
PKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP
VLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGGSSSTAS
GSGSGSGTAGSSGGAGSSGGSTTAGGSASGSGSTGSGTGGASSGGASGASGPCPAPNL
LGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWNVEVHTAQTQTHRE
DYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
PEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGDSYFMYSK
RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*

5 El ADN que codifica cada uno de los polipéptidos Fc monocatenarios se sintetizó con la misma molécula biológicamente activa en el extremo amino, a saber, el dominio VHCH1 del anticuerpo MOX46.

Los polipéptidos Fc monocatenarios que comprenden las versiones 1, 2 y 3 anteriores se expresaron en un vector pVAX (Invitrogen) en las células HEK293 (una línea celular epitelial de riñón embrionario de humano) mediante el uso de una secuencia líder de anticuerpo (del anticuerpo de ratón B72.3 (Whittle et al., 1987, *Protein Eng.* 1(6) 499-505)). La cadena VLCL del fragmento Fab de MOX46 se produjo en la misma célula, pero en un vector distinto.

10 Los polipéptidos Fc monocatenarios resultantes se purificaron usando proteína A.

Ejemplo 2: Fijación del antígeno

15 La capacidad que tiene los polipéptidos Fc monocatenarios (versiones 1 y 3) para fijarse al antígeno se comparó con las mismas regiones variables de anticuerpo (del anticuerpo MOX46) expresadas en una región flanqueante de IgG1 murino y una IgG irrelevante. Las células NSO recombinantes que expresan el antígeno en su superficie (5×10^5) se incubaron con 100 μ l de los polipéptidos Fc monocatenarios durante 30 minutos a 4 °C. El control era MOPC21 que se tituló desde 5 μ g/ml hacia abajo en diluciones de 1/3. La IgG MOX46 y las construcciones Fc monocatenarias se titularon en diluciones de 1/3. Las células se lavaron dos veces en PBS de Dulbecco con SBF al 5% y azida de sodio al 0,1%, y a continuación se le añadieron durante 30 minutos a 4 °C 100 μ l de anticuerpo antirratón marcado con PE en las cadenas ligera y pesada (Jackson) diluido 1/250. Las células se lavaron una vez más como antes y se analizaron mediante citometría de flujo.

20 Ambas construcciones de Fc monocatenario ensayadas se fijaron al antígeno (1.1 y 3.1), al igual que hizo la IgG MOX46. El control irrelevante no se fijó al antígeno. Véase la figura 4a.

25 La capacidad que tienen los polipéptidos Fc monocatenarios (versiones 1, 2 y 3) para fijarse al antígeno también se analizó mediante los métodos descritos más arriba; sin embargo, en vez de las células NSO recombinantes, se utilizaron los linfocitos T activados primarios que expresan de forma natural el antígeno en su superficie. Los linfocitos T activados primarios se produjeron como sigue: 1×10^6 esplenocitos D011 se cultivaron con 200 ng/ml del péptido 323-329 de la ovoalbúmina durante 3 días, se lavaron y se resuspendieron en dos veces el volumen del medio durante 2 días más. A continuación, las células activadas se purificaron mediante el aislamiento negativo de los linfocitos T CD4.

30 Las tres construcciones Fc monocatenarias se fijaron al antígeno, al igual que hizo la IgG MOX46. El control irrelevante no se fijó al antígeno. Véase la figura 4b.

Ejemplo 3: Fijación al receptor de Fc

35 La capacidad que tienen las versiones 1 y 3 del Fc monocatenario para fijarse a los receptores de Fc CD64 (FcyRII) y CD32 (FcyRI) se determinó mediante BIAcore. CD64 y CD32 se inmovilizaron (aproximadamente 1000 UR de cada uno) mediante química de acoplamiento por aminas en las células de flujo 2 y 3 (respectivamente) de un chip Biacore CM5 estándar. La célula de flujo 1 se estableció como célula de flujo de referencia para comprobar la fijación de fondo. A continuación, las proteínas Fc monocatenarias se inyectaron de forma secuencial sobre el chip para buscar la actividad de fijación. Todas las muestras se usaron sin diluir y en diluciones 1:2 y 1:5. La fijación de fondo era insignificante con todas las muestras.

40 Las dos versiones 1 y 3 de Fc monocatenario se encontró que se fijaban tanto a CD64 como a CD32.

Ejemplo 4: Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento con células recombinantes NS0

Las versiones 1 y 3 de Fc monocatenario se analizaron por su capacidad para provocar la citotoxicidad mediada por el complemento en las células a las que se fijaron.

5 Una línea NS0 recombinante que expresa el antígeno relevante en su superficie (5×10^6 células por mililitro de medio) se mezcló con 50 μ l/ml de complemento de gazapo (Serotec C12CA). Antes de ser usado, el complemento se reconstruyó con 2 ml de agua destilada enfriada en hielo de calidad para cultivo de tejidos. Se utilizó en menos una hora desde la reconstitución y se mantuvo en hielo hasta su uso. Los agentes analizados estaban a una concentración de 2 μ g/ml y se sembraron en una placa de 96 pocillos (Costar) en volúmenes de 100 μ l por duplicado. Se le añadió por pocillo 100 μ l de la mezcla de células/complemento y la placa se incubó a 37 °C durante 10 horas. La citotoxicidad se valoró mediante la captación de la tinción vital, yoduro de propidio (PI) mediante FACS. Se preparó una solución de reserva de PI a 20 mg/ml (Molecular Probes P-1304MP) en agua destilada y a continuación se diluyó en RPMI 1640 para dar una concentración final en el pocillo de 3 μ g/ml. Las células se incubaron durante 10 min a TA en la oscuridad, antes de analizarlas mediante citometría de flujo.

15 La figura 5a (con complemento) y la figura 5b (sin complemento) muestran que ambas versiones 1 y 3 de los polipéptidos Fc monocatenarios (1.1 y 3.1) inducen la citotoxicidad dependiente del complemento.

Ejemplo 5: Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento con linfocitos T activados

(i) Las versiones 1, 2 y 3 de Fc monocatenario se analizaron por su capacidad para provocar la citotoxicidad mediada por el complemento en los linfocitos T activados que expresan el antígeno fijado mediante el anticuerpo MOX46 de su superficie. Los métodos utilizados fueron los que están descritos en el ejemplo 4, excepto que se utilizaron los linfocitos T activados primarios en vez de las células NS0 y se produjeron como se describe en el ejemplo 2.

El porcentaje de lisis específica se calculó como sigue:

$$\frac{\% \text{ de células positivas con PI en la condición experimental} - \% \text{ de fondo de células positivas con PI}}{\% \text{ máximo de células positivas con PI (tampón de lisis)} - \% \text{ de fondo de células positivas con PI}}$$

25 Se encontró que las tres versiones de los polipéptidos Fc monocatenarios inducen la citotoxicidad dependiente del complemento (figura 5c).

(ii) Otro polipéptido Fc monocatenario (versión 3) que comprende un fragmento Fab de anticuerpo procedente del anticuerpo murino, 495, que se fija a un antígeno proteico diferente de la superficie celular se produjo como formato de IgG1 y de IgG2a mediante el uso de las regiones Fc murinas. Se analizó la capacidad de estas proteínas scFc para provocar la citotoxicidad mediada por el complemento de los linfocitos T activados que expresan el antígeno fijado mediante el anticuerpo 495 en su superficie. Los métodos utilizados fueron tal y como se describen en el ejemplo 4, excepto que se utilizaron los linfocitos T activados primarios que se produjeron tal y como se describe en el ejemplo 2.

35 La figura 5d ilustra con claridad que, como se esperaba, sólo el formato de IgG2a del Fc monocatenario y el formato de IgG2b del anticuerpo completo 495 eran capaces de inducir la citotoxicidad dependiente del complemento. Los formatos de IgG1 no consiguieron inducir la citotoxicidad dependiente del complemento.

Método 6: Fusión receptor-scFc

40 El dominio 1 del receptor gap130 de humano se clonó como una proteína de fusión de Fc (γ 1 de ratón) monocatenaria mediante el formato de Fc monocatenario ilustrado en la figura 1a. La secuencia de la proteína de fusión se muestra a continuación.

ES 2 651 309 T3

Proteína de fusión del dominio 1 de gp130 con scFV (SEQ ID n.º 91)

```

KLATMSVPTQ VLGLLLLLWLT DARCELLDPC GYISPESPVV QLHSNFTAVC VLKEKCMDYF HVNANYIVWK
TNHFTIPKEQ YTIINRTASS VTFTDIASLN IQLTCNILTF GQLEQNVYGI TIISGSSAVP RDGGSKPGIC
TVPEVSSVFI FPPKPKDVLIT ITLTPKVICV VVDISKDDPE VQFSWFVDDV EVHTAQTQPR EEQFNSTFRS
VSELPIMHQD WLNKKEFKCR VNSAAFPAPI EKTISKTKGR PKAPQVYTIP PPKEQMAKDK VSLTCMITDF
FPEDITVEWQ WNGQPAENYK NTQPIMDTDG SYFVYSKLVN QKSNWEAGNT FTCSVLHEGL HNHHTEKSLK
HSPGKGGSSIT ASGSGSGGSG TAGSSGGAGS SGGSTTAGGS ASGSGSTGSG TGGASSGGAS GASGVPRDGG
SKPGICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLITITLT PKVTCVVVDI SKDDPEVQFS WVDDVEVHT AQTQPREEQF
NSTFRSVSEL PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE QMAKDKVSLT
CMITDFFPED ITVEWQWNGQ PAENYKNTQP IMDTDGSYFV YSKLVNQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNHH
TEKSLSHSPG K*

```

5 La secuencia en negrita representa el dominio 1 del receptor gp130 (aminoácidos 1 a 125 de la SEQ ID n.º 91). La secuencia del conector está subrayada. Las secuencias bisagra están en cursiva y, cuando forman parte del conector, están en cursiva y subrayadas. La secuencia «SSA» entre el extremo carboxilo del dominio 1 de gp130 y la primera secuencia bisagra son los aminoácidos necesarios para introducir el sitio de restricción de XhoI necesario con fines de clonación.

10 Las construcciones se expresaron transitoriamente en un sistema de células de mamífero (CHO L761) utilizando un vector pVAX y la secuencia señal de ratón B72.3. Se preparó un análisis de inmunotransferencia utilizando la proteína scFc resultante y la transferencia se hibridó con una sonda de Fc antirratón con HRP (Jackson 115-035-071) y también con el policlonal anti-gp130 biotinilado (R&D BAF228), revelado con una estrep-HRP. Se detectó una proteína que correspondía al tamaño predicho de la proteína de fusión del dominio 1 de gp130 en el análisis de inmunotransferencia. Los intentos anteriores para expresar el dominio 1 de gp130 por sí solo o uniéndole una etiqueta de His no han tenido éxito. La fusión del dominio 1 de gp130 al polipéptido Fc monocatenario permitió
15 expresar el dominio 1 de gp130.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido Fc monocatenario, en donde la secuencia desde el extremo amino al extremo carboxilo es:
un primer dominio CH2 unido por su extremo carboxilo al extremo amino de un primer dominio CH3, y
5 dicho primer dominio CH3 está unido por su extremo carboxilo a través de un conector de longitud aminoacídica que comprende repeticiones de una secuencia seleccionada de GS, GSGGS, GGGGS y GGGGS al extremo amino del segundo dominio CH2 que está unido por su extremo carboxilo al extremo amino del segundo dominio CH3,
en donde los dominios Fc, en dicho polipéptido Fc monocatenario, consisten en dos dominios CH2 y dos dominios CH3, caracterizado por formar dichos dominios CH2 y CH3 un dominio Fc funcional dentro de la cadena polipeptídica, en la que un primer dominio CH2 está dimerizado con un segundo dominio CH2 y un primer dominio
10 CH3 está dimerizado con un segundo dominio CH3 dentro de la cadena polipeptídica, y
unido al extremo amino de un primer dominio CH2, de dicho polipéptido Fc monocatenario, está una molécula biológicamente activa que es una proteína de unión monovalente seleccionada del grupo que consiste en: scFv, Fab, Fab', V_{HH}, Fv, V_K, V_H y V_L.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el conector entre el extremo carboxilo del primer dominio CH3 y el extremo amino del segundo dominio CH2 tiene entre 30 y 130 aminoácidos de longitud.
3. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el conector comprende uno o varios restos de cisteína.
4. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el conector comprende toda o parte de una secuencia bisagra de anticuerpo o de una secuencia bisagra de anticuerpo modificada.
- 20 5. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada dominio CH2 comprende la secuencia dada en la SEQ ID n.º 2 o la SEQ ID n.º 15 o la SEQ ID n.º 28 o la SEQ ID n.º 41.
6. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada dominio CH3 comprende la secuencia dada en la SEQ ID n.º 3 o la SEQ ID n.º 16 o la SEQ ID n.º 29 o la SEQ ID n.º 42.
7. Un polipéptido Fc monocatenario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la molécula biológicamente activa y el polipéptido Fc monocatenario están unidos por un conector peptídico que tiene entre 1 y
25 100 aminoácidos de longitud.
8. Un polipéptido Fc monocatenario de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el conector comprende un resto de cisteína.
9. Una secuencia de ADN aislada que codifica el polipéptido Fc monocatenario de acuerdo con cualquiera de las
30 reivindicaciones 1 a 8.
10. Un vector de clonación o de expresión que comprende una o varias secuencias de ADN de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una célula hospedadora que comprende uno o varios vectores de expresión o de clonación de acuerdo con la reivindicación 10.
- 35 12. Un procedimiento para la producción del polipéptido Fc monocatenario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende el cultivo de la célula hospedadora de la reivindicación 11 y el aislamiento del polipéptido Fc monocatenario.
13. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido Fc monocatenario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en combinación con uno o varios de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
40
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además otros ingredientes activos.

Figura 1

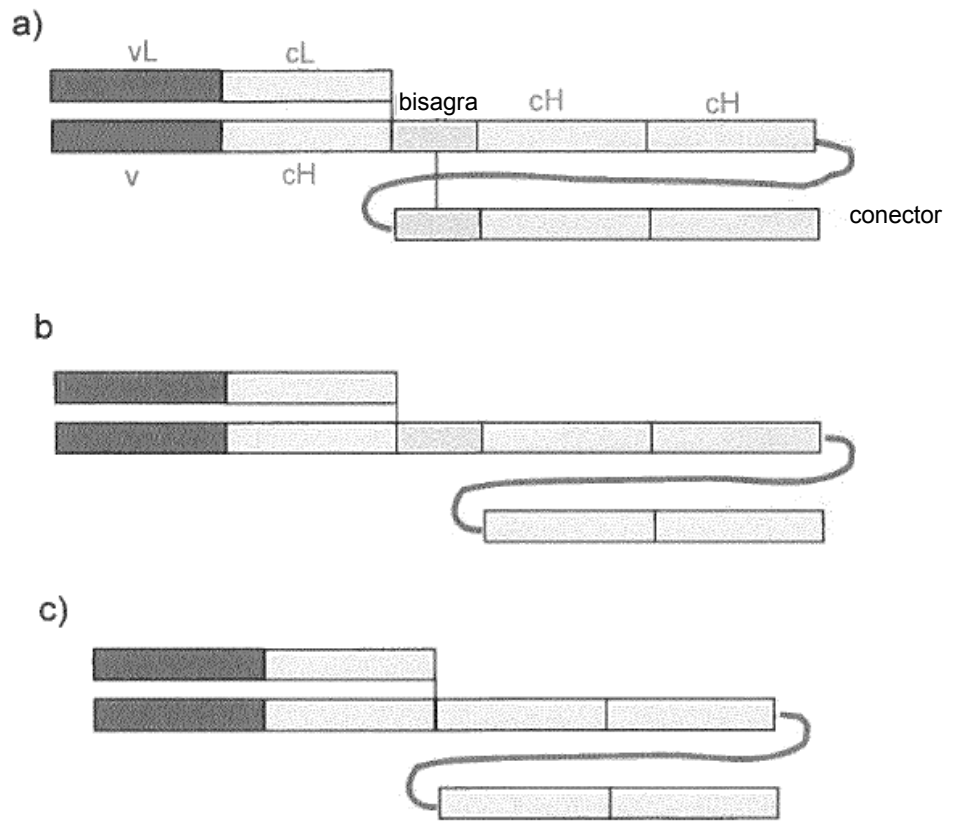


Figura 2

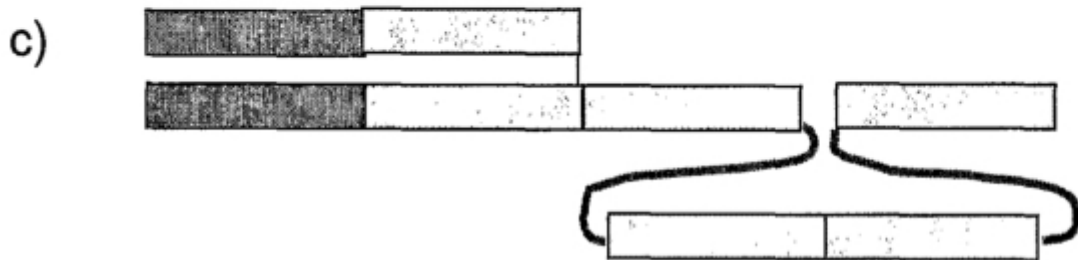
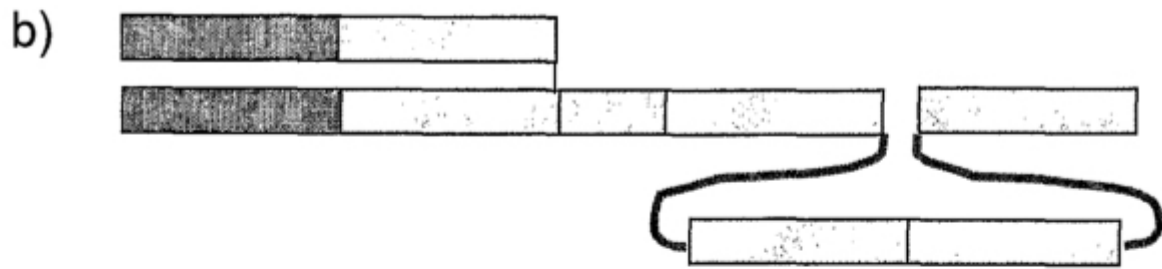
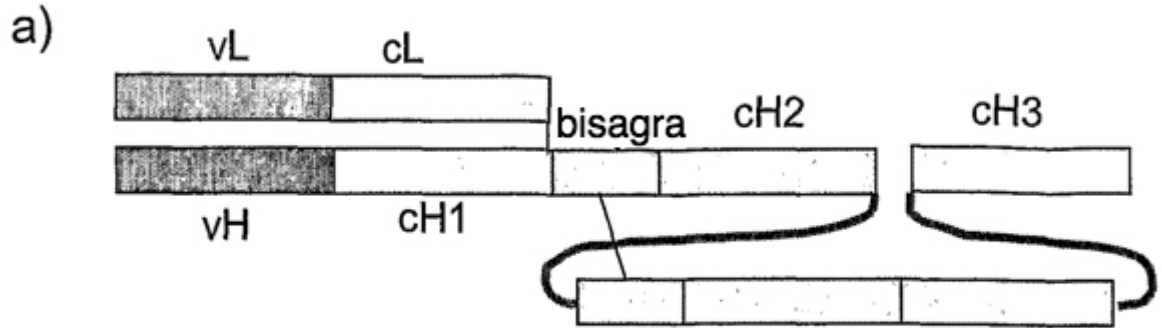
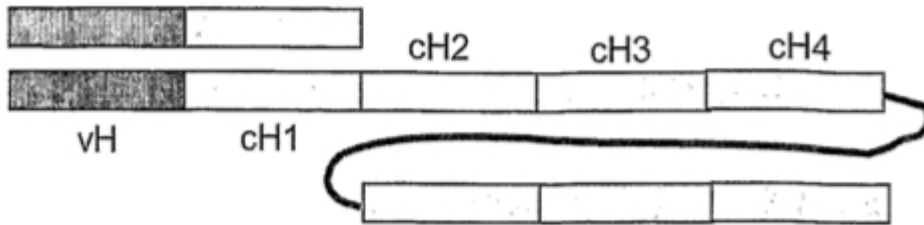
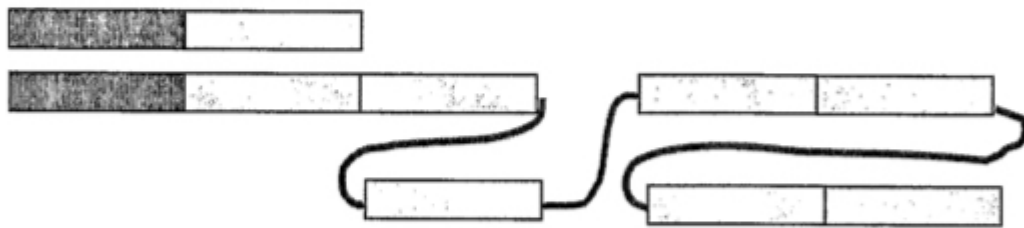


Figura 3

a)



b)



c)

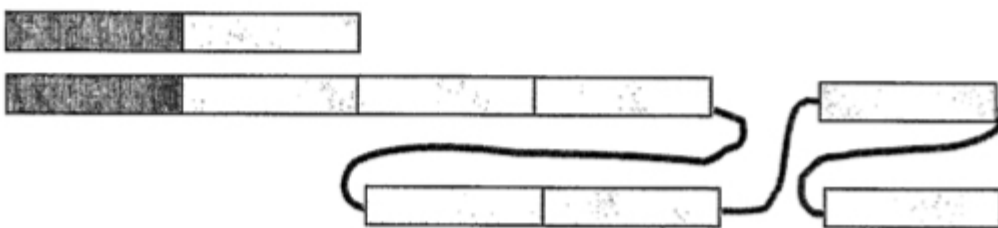


Figura 4a

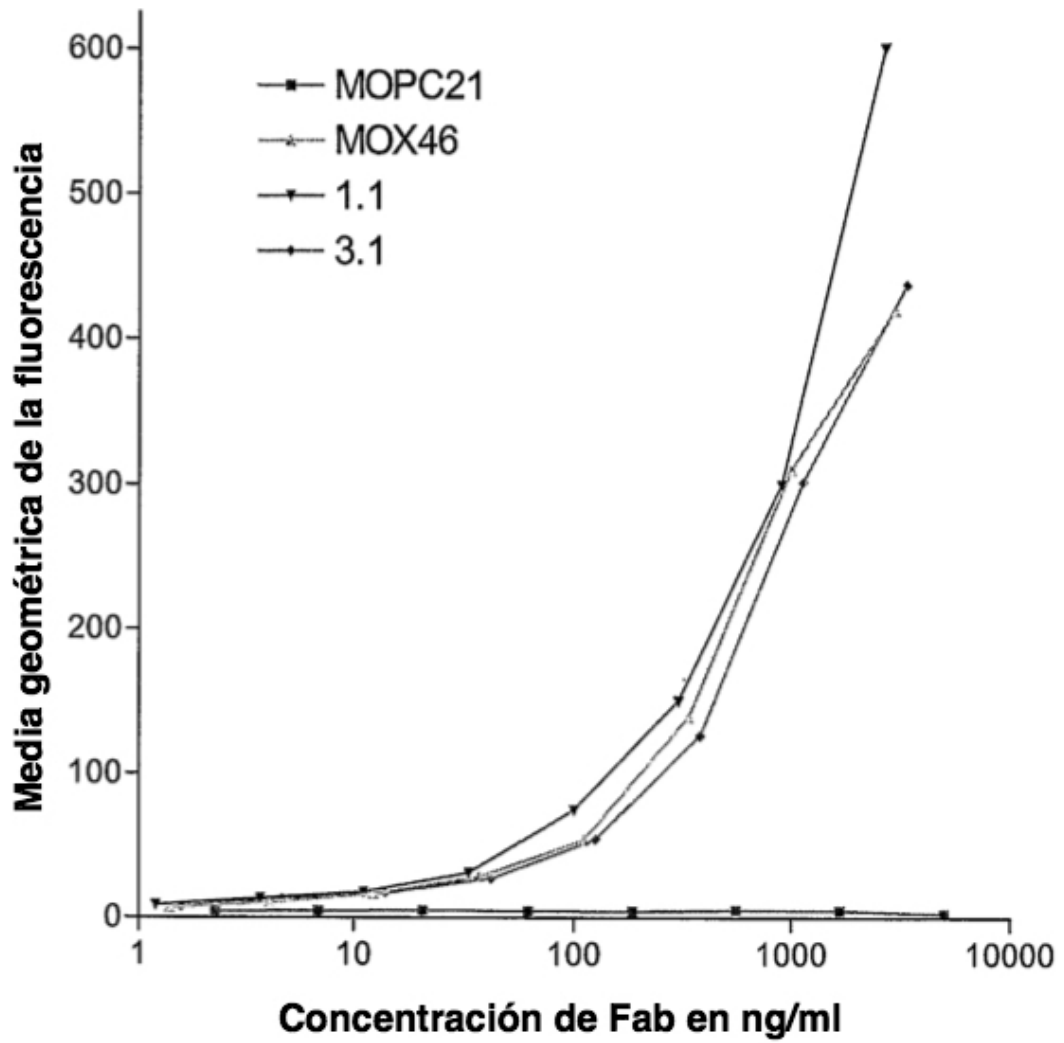


Figura 4b

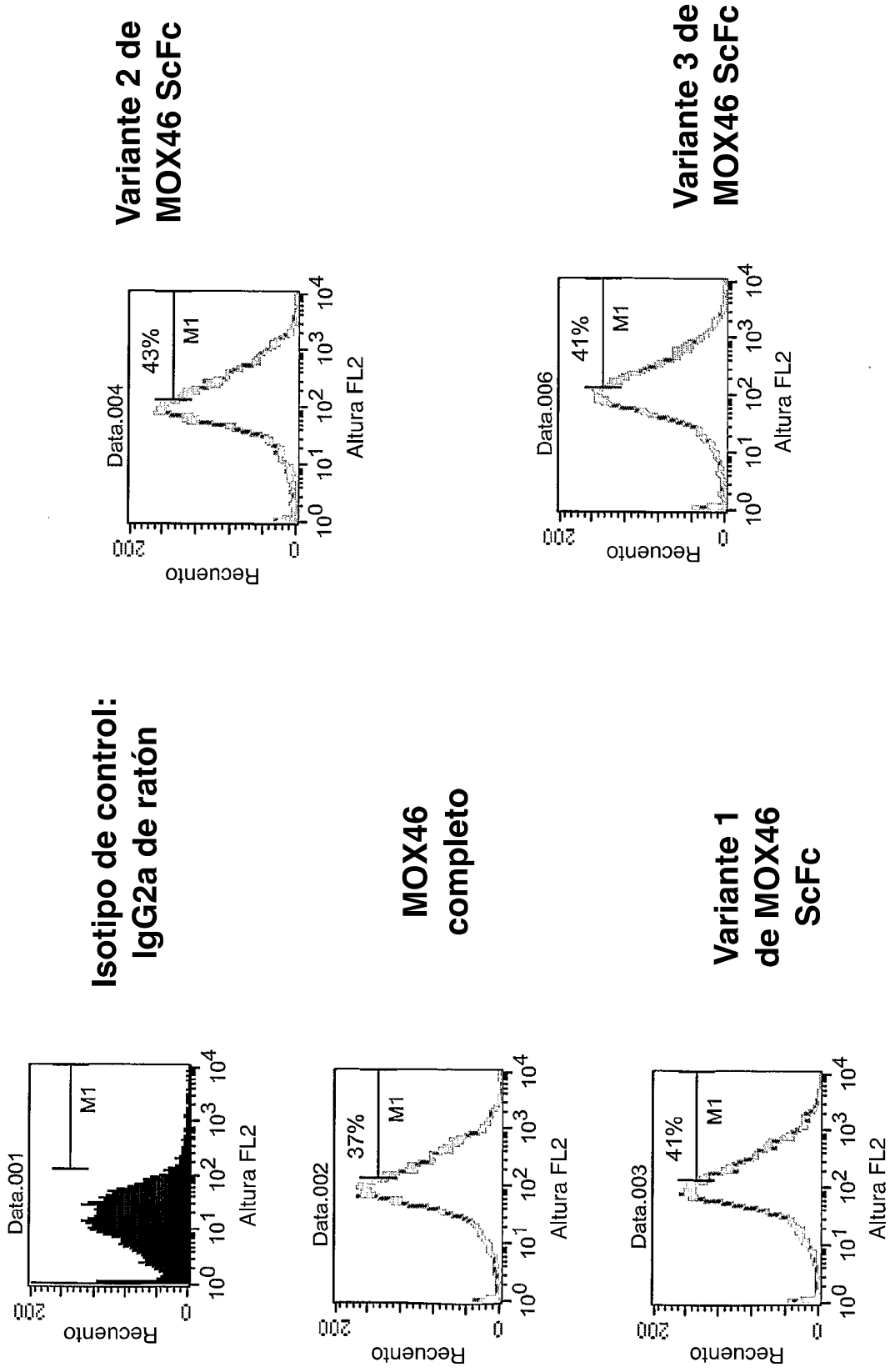


Figura 5a

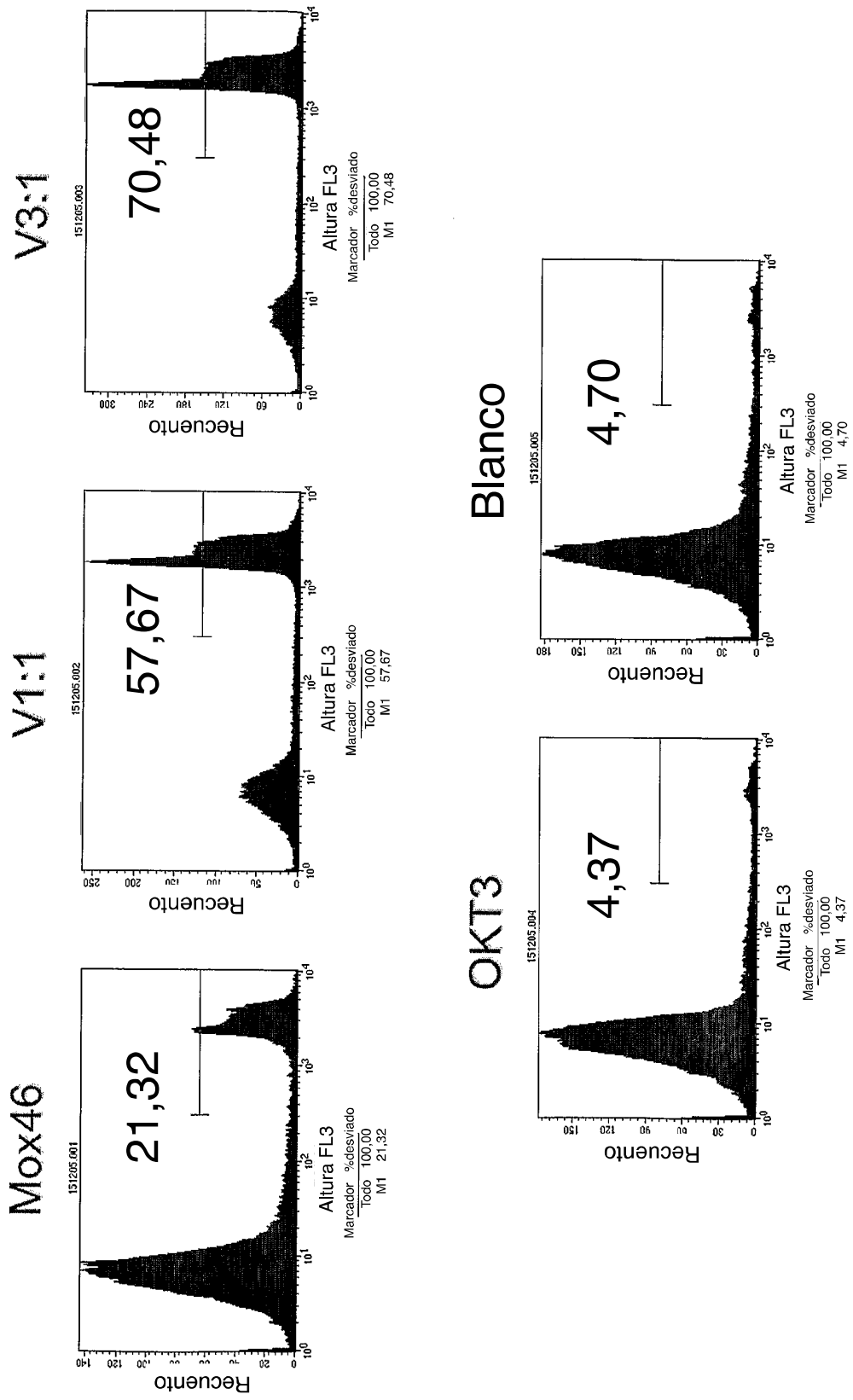


Figura 5b

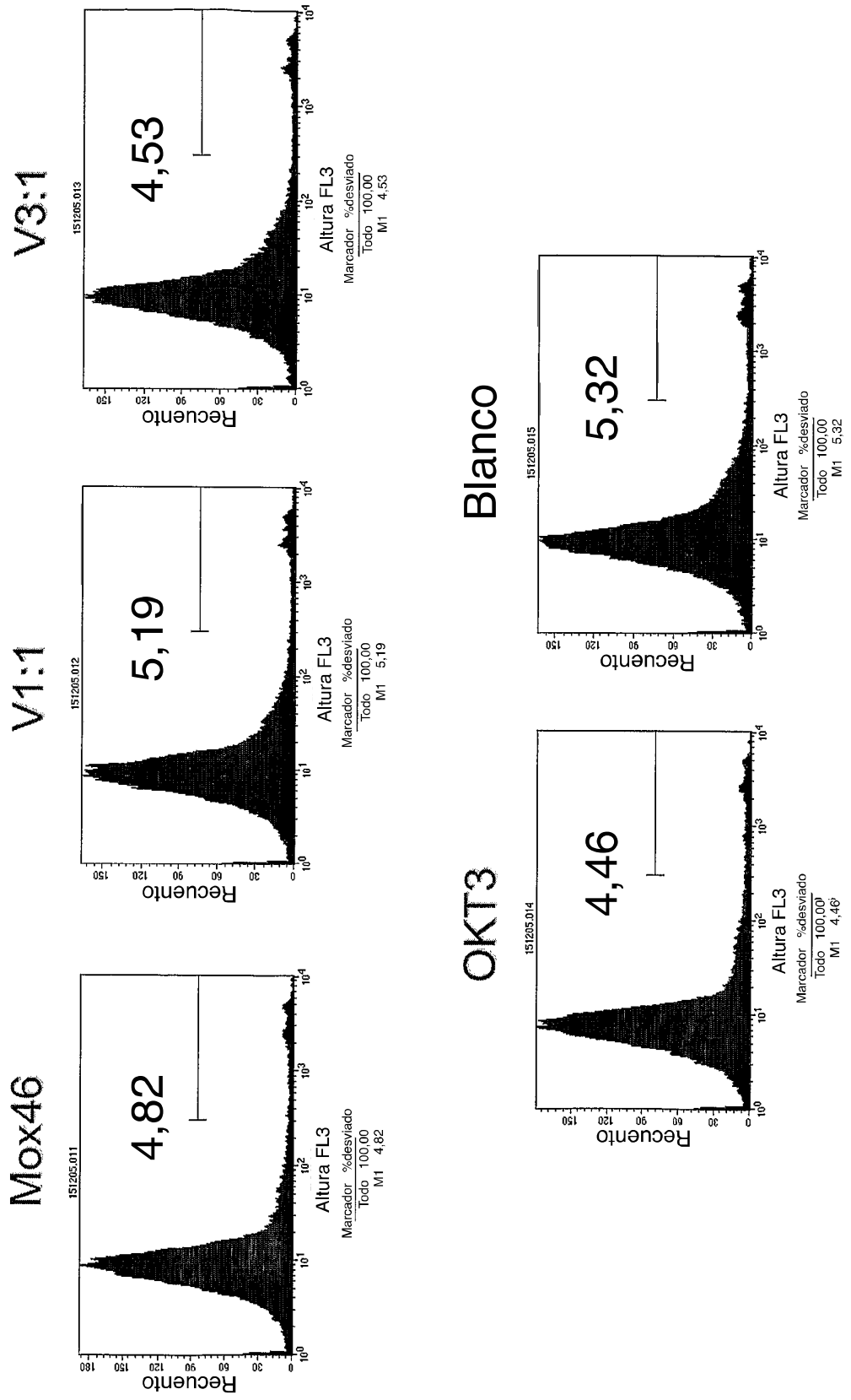


Figura 5c

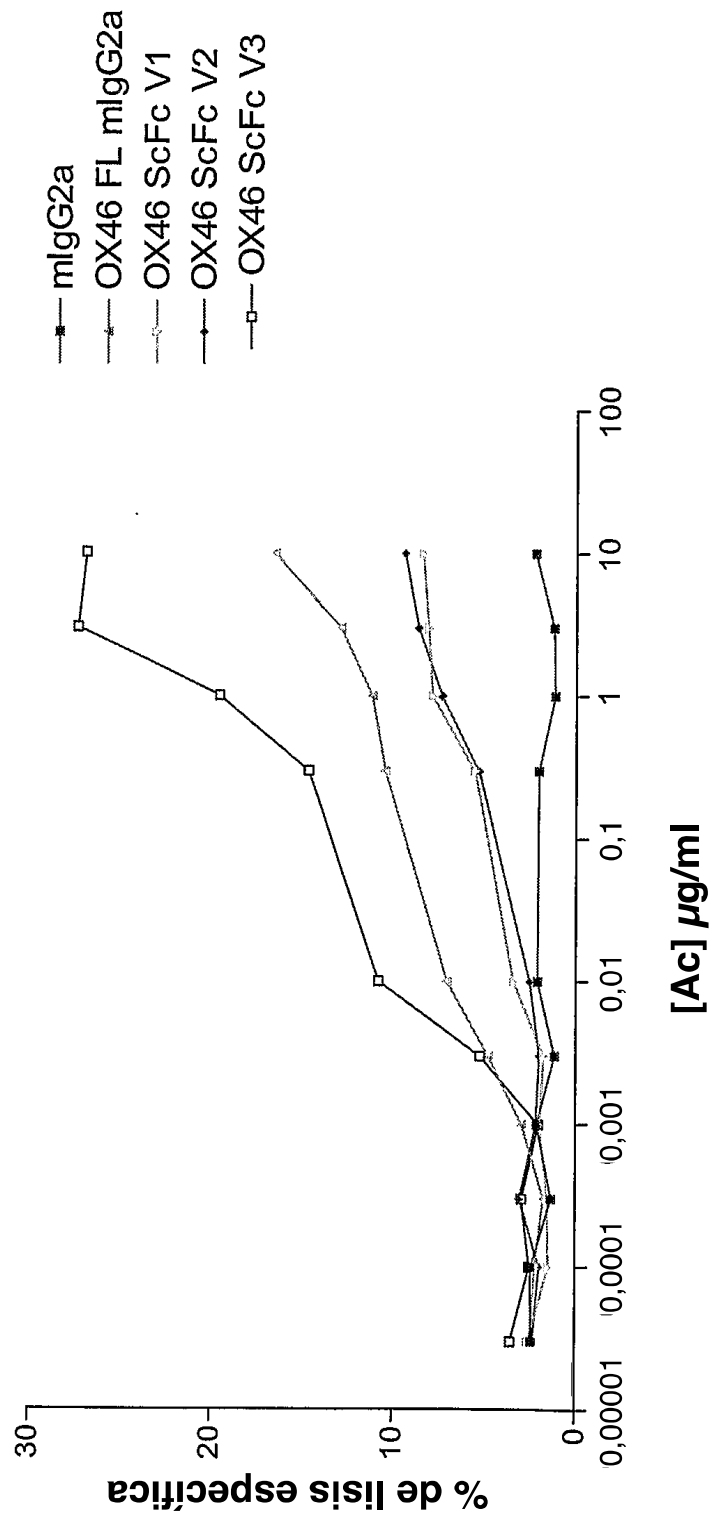


Figura 5d

