

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 969**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/EP2011/073567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085069**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11810589 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2659275**

54 Título: **Detección de un dímero polipeptídico por un agente de unión bivalente**

30 Prioridad:

23.12.2010 EP 10196687

13.07.2011 EP 11173844

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

01.03.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

GERG, MICHAEL;

HEINDL, DIETER;

MERTENS, ALFRED;

RUTZ, CHRISTOPH;

SCHRAEML, MICHAEL;

SOUKUPOVA, MONIKA;

SUSTMANN, CLAUDIO;

TACKE, MICHAEL y

VAN DIECK, JAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 656 969 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección de un dímero polipeptídico por un agente de unión bivalente

5 Antecedentes de la invención

El presente documento se refiere a un agente de unión bivalente capaz de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el agente de unión en dos fijadores monovalentes que se unen entre sí a través de un conector, en el que el primer fijador monovalente se une a un epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que el segundo fijador monovalente se une a un epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que cada fijador monovalente tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ hasta $10^{-4}/s$, y en el que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos. También se divulgan un procedimiento para preparar dicho agente de unión bivalente y el uso de dicho agente bivalente en procedimientos de tinción histológica.

15 Muchas proteínas, especialmente muchas moléculas de receptores unidos a la membrana, son inactivas como monómeros y activadas por homo y/o heterodimerización. La detección específica de homodímeros o heterodímeros de dichas moléculas de receptores contra el fondo de moléculas únicas no dimerizadas es un desafío tremendo.

El documento US5635602 divulga un procedimiento en el que se sintetizan dos oligonucleótidos complementarios monocatenarios (A y B), cada uno de ellos con un extremo 5' tiolado. En dos reacciones, el oligonucleótido monocatenario A se acopla a un fragmento Fab'(1) y, por separado del primero, el oligonucleótido monocatenario B se acopla a un fragmento Fab'(2). Después de las etapas de separación con HPLC de intercambio aniónico, los dos fragmentos acoplados se combinan para formar un compuesto bipartito. De manera reseñable, los dos fragmentos de anticuerpo diferentes se enlazan por un único oligonucleótido bicatenario, y cada miembro monocatenario del mismo se acoplan a un único fragmento de anticuerpo.

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que puede proporcionarse un agente de unión bivalente que es capaz de unirse a un homodímero o heterodímero y al mismo tiempo no mostrar una unión significativa con la forma monomérica del polipéptido comprendido en el homodímero o con ninguno de los dos polipéptidos comprendidos en el heterodímero.

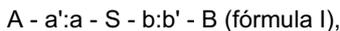
Resumen de la invención

En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un agente de unión bivalente capaz de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el agente de unión en dos fijadores monovalentes que se unen entre sí a través de un conector, en el que el primer fijador monovalente se une a un epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que el segundo fijador monovalente se une a un epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que cada fijador monovalente tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ hasta $10^{-4}/s$, y en el que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.

También se divulga un procedimiento para obtener un agente de unión bivalente que se une específicamente a un dímero polipeptídico, comprendiendo el procedimiento las etapas de seleccionar un primer fijador monovalente que se une a un primer polipéptido diana con una K_{diss} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$, seleccionando un segundo fijador monovalente que se une a un segundo polipéptido diana con una K_{diss} de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$, acoplando ambos fijadores monovalentes mediante un conector y seleccionando un agente de unión bivalente que tiene un valor de K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.

También se describe el uso del nuevo agente de unión bivalente, especialmente en un procedimiento inmunohistoquímico.

Un primer aspecto de la invención es un agente de unión bivalente de fórmula I



siendo el agente de unión bivalente capaz de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el dímero en dos cadenas polipeptídicas asociadas,

a) en la que A es un primer fijador monovalente, que se une a un único epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en la que B es un segundo fijador monovalente, que se une a un único epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero,

b) en la que cada fijador monovalente A y B se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un péptido mimético, un aptámero, un *spiegelmer*, una darpina, una lectina, una proteína con repeticiones de anquirina, un dominio de tipo Kunitz, un anticuerpo de dominio único y un fragmento monovalente de un anticuerpo, y tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$,

c) en la que cada uno de a':a y b:b' es independientemente un par de unión, en el que a':a y b:b' son diferentes, en la que S es un espaciador, en la que - representa un enlace covalente,

d) en la que a - S - b es un conector que tiene una longitud de 6 a 100 nm,

e) en la que los miembros de los pares de unión a':a y b:b' son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, y

f) en la que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.

Un segundo aspecto de la invención es un procedimiento para formar un agente de unión bivalente que se une específicamente a un dímero polipeptídico, consistiendo el dímero en dos cadenas polipeptídicas asociadas, comprendiendo el procedimiento las etapas de

a) seleccionar un primer fijador monovalente seleccionado del grupo que consiste en un péptido, un péptido mimético, un aptámero, un *spiegelmer*, una darpina, una lectina, una proteína con repeticiones de anquirina, un dominio de tipo Kunitz, un anticuerpo de dominio único y un fragmento monovalente de un anticuerpo, que se une a un único epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero con una K_{diss} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$,

b) seleccionar un segundo fijador monovalente seleccionado del grupo que consiste en un péptido, un péptido mimético, un aptámero, un *spiegelmer*, una darpina, una lectina, una proteína con repeticiones de anquirina, un dominio de tipo Kunitz, un anticuerpo de dominio único y un fragmento monovalente de un anticuerpo, que se une a un único epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero con una K_{diss} de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$,

c) acoplar el primer fijador monovalente a un miembro de un primer par de unión de secuencias de ADN hibridantes y el segundo fijador monovalente a un miembro de un segundo par de unión de secuencias de ADN hibridantes, en la que el primer y el segundo par de unión no interfieren entre sí, y un conector que tiene una longitud de 6 a 100 nm y que comprende un espaciador y los miembros del par de unión complementarios al primer y al segundo miembro del par de unión, respectivamente, se coincuban, formándose de este modo un agente de unión bivalente.

d) seleccionar un agente de unión bivalente que tenga un valor de K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos,

formando de este modo un agente de unión bivalente que se une específicamente al dímero polipeptídico.

Un tercer aspecto de la invención es un procedimiento de tinción histológica para un dímero polipeptídico, comprendiendo el procedimiento las etapas de

a) proporcionar una muestra celular o tisular,

b) incubar dicha muestra con un agente de unión bivalente de acuerdo con la invención, y

c) detectar el agente de unión bivalente, tiñendo de ese modo dicha muestra para el dímero polipeptídico.

Un cuarto aspecto de la invención es el uso de un agente de unión bivalente de acuerdo con la invención en la tinción de una muestra celular o tisular.

Descripción detallada de la invención

En un modo de realización, el presente documento se refiere a un agente de unión bivalente capaz de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el agente de unión en dos fijadores monovalentes que se enlazan entre sí a través de un conector,

a) en el que el primer fijador monovalente se une a un epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero,

b) en el que el segundo fijador monovalente se une a un epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero,

c) en el que cada fijador monovalente tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$, y

d) en el que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.

La presente invención proporciona un agente de unión bivalente de fórmula I

A - a':a - S - b:b' - B (fórmula I),

siendo el agente de unión bivalente capaz de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el dímero en dos cadenas polipeptídicas asociadas,

- 5 a) en la que A es un primer fijador monovalente, que se une a un único epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en la que B es un segundo fijador monovalente, que se une a un único epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero,
- 10 b) en la que cada fijador monovalente A y B se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un péptido mimético, un aptámero, un *spiegelmer*, una darpina, una lectina, una proteína con repeticiones de anquirina, un dominio de tipo Kunitz, un anticuerpo de dominio único y un fragmento monovalente de un anticuerpo, y tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$,
- 15 c) en la que cada uno de a':a y b':b' es independientemente un par de unión, en el que a':a y b':b' son diferentes, en la que S es un espaciador, en la que - representa un enlace covalente,
- d) en la que a - S - b es un conector que tiene una longitud de 6 a 100 nm,
- 20 e) en la que los miembros de los pares de unión a':a y b':b' son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, y
- f) en la que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.

25 A veces, un solo polipéptido es suficiente para que la proteína sea activa. Como se ha indicado anteriormente, a menudo, sin embargo, dos o más polipéptidos necesitan interactuar para permitir que una proteína lleve a cabo su función particular. Si este es el caso, se habla, por ejemplo, de un dímero proteico o polipeptídico en caso de que dos cadenas polipeptídicas se asocien entre sí. La formación del dímero es el resultado de interacciones entre dos cadenas polipeptídicas y/o puede desencadenarse mediante la unión de un ligando. Los dímeros se mantienen unidos mediante enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y, con menor frecuencia, interfaces hidrófobas y enlaces disulfuro intercatenarios.

30 La homodimerización y/o heterodimerización de receptores es un mecanismo extremadamente importante en la regulación de actividades celulares y procesos fisiológicos y/o patológicos.

35 Un dímero en el sentido de la presente invención está presente si dos cadenas polipeptídicas se asocian y forman un complejo biológicamente relevante. El dímero puede ser un dímero unido a la membrana o puede ser un dímero presente en la circulación, es decir, un complejo de dos polipéptidos que es estable en condiciones fisiológicas. En un modo de realización, las dos cadenas polipeptídicas en un dímero (como se presentan en la naturaleza) no se unen de forma covalente sino que se mantienen juntas por interacciones proteína-proteína, por ejemplo, basadas en puentes iónicos o en fuerzas de van der Waals.

40 El agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención es un agente de unión que comprende exactamente dos fijadores monovalentes.

45 En un modo de realización preferente, las propiedades de velocidad cinética de cada fijador monovalente y del agente de unión bivalente se caracterizan por la tecnología SPR Biacore™ como se describe en detalle en los ejemplos.

50 Como apreciará el experto en la técnica, el agente de unión bivalente descrito en la presente invención se puede aislar y purificar como se desee. En un modo de realización, la presente invención se refiere a un agente de unión bivalente aislado como se divulga en el presente documento. Un agente de unión bivalente «aislado» es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de, por ejemplo, la mezcla de reactivo utilizada en la síntesis de dicho agente de unión bivalente. Los componentes no deseados de dicha mezcla de reacción son, por ejemplo, fijadores monovalentes que no terminan en el agente de unión bivalente deseado. En un modo de realización, el agente de unión bivalente se purifica a más de un 80 %. En algunos modos de realización, el agente de unión bivalente se purifica a más de un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % en peso, respectivamente. En caso de que ambos fijadores monovalentes sean polipéptidos, la pureza se determina fácilmente, por ejemplo, mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando, por ejemplo, azul de Coomassie o colorante de plata en la detección de proteínas. En caso de que la pureza se evalúe a nivel de ácido nucleico, se aplica cromatografía de exclusión por tamaño para separar el agente de unión bivalente de los productos secundarios y se vigila la DO a 260 nm para evaluar su pureza.

60 Los artículos «un/uno» y «una» se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un anticuerpo» quiere decir un anticuerpo o más de un anticuerpo.

65 El término «oligonucleótido» o «secuencia de ácido nucleico», como se usa en el presente documento, se refiere en general a polinucleótidos cortos, generalmente de cadena sencilla, que comprenden un mínimo de 8 nucleótidos y un

máximo de aproximadamente 1000 nucleótidos. En un modo de realización preferente, un oligonucleótido tendrá una longitud de al menos 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27 o 30 nucleótidos. En un modo de realización preferente, un oligonucleótido tendrá una longitud de no más de 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 o 30 nucleótidos. La descripción dada a continuación para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

5 El término oligonucleótido debe entenderse de forma amplia e incluye ADN y ARN así como análogos y modificación de los mismos.

10 Un oligonucleótido puede contener, por ejemplo, un nucleótido sustituido que lleva un sustituyente en las bases estándar desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG), desoxicitosina (dC), desoxitimidina (dT), desoxiuracilo (dU). Ejemplos de dichas nucleobases sustituidas son: pirimidinas 5-sustituidas como 5-metil-dC, aminoalil-dU o -dC, 5-(aminoetil-3-acrilimido)-dU, 5-propinil-dU o -dC, dU o dC 5-halogenada; pirimidinas N-sustituidas como N4-etil-dC; purinas N-sustituidas como N6-etil-dA, N2-etil-dG; purinas 8-sustituidas como 8-[6-amino]-hex-1-il]-8-amino-dG o -dA, dA o dG 8-halogenada, 8-alquil-dG o -dA y dA 2-sustituida como 2-amino-dA.

15 Un oligonucleótido puede contener un nucleótido o un análogo nucleosídico. Es decir, las nucleobases naturales se pueden intercambiar usando análogos de nucleobases como 5-nitroindol-d-ribósido; 3-nitro-pirrol-d-ribósido, desoxiinosina (dI), deoxixantosa (dX); 7-desaza-dG, -dA, -dI o -dX; 7-desaza-8-aza-dG, -dA, -dI o -dX; 8-aza-dA, -dG, -dI o -dX; d-formicina; pseudo-dU; pseudo-iso-dC; 4-tio-dT; 6-tio-dG; 2-tio-dT; iso-dG; 5-metil-iso-dC; 8-aza-7-desaza-dA unido por N8; 5,6-dihidro-5-aza-dC; y eteno-dA o pirol-dC. Como es obvio para el experto en la técnica, la nucleobase en la cadena complementaria tiene que seleccionarse de tal manera que la formación de dúplex sea específica. Si, por ejemplo, se usa 5-metil-iso-dC en una cadena (por ejemplo (a)), la iso-dG tiene que estar en la cadena complementaria (por ejemplo (a')).

25 El esqueleto del oligonucleótido puede modificarse para contener residuos de azúcares sustituidos, análogos de azúcares, modificaciones en el resto fosfato internucleosídico y/o ser un PNA.

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

35 Los análogos de azúcares son por ejemplo xilosa; ribosa con un puente en 2',4' como (2'-O,4'-C- metileno) (oligómero conocido como LNA) o (2'-O,4'-C-etileno) (oligómero conocido como ENA); L-ribosa, L-d-ribosa, hexitol (oligómero conocido como HNA); ciclohexenilo (oligómero conocido como CeNA); alritol (oligómero conocido como ANA); un análogo de ribosa tricíclica en el que los átomos C3' y C5' se conectan por un puente de etileno que se fusiona con un anillo de ciclopropano (oligómero conocido como triciclo-ADN); glicerina (oligómero conocido como GNA); glucopiranosas (oligómero conocido como homo-ADN); carbarribosa (con un ciclopentano en lugar de una subunidad de tetrahidrofurano); hidroximetilmorfolina (oligómeros conocidos como morfolino-ADN).

40 También se sabe que un gran número de modificaciones del resto fosfato internucleosídico no interfieren en las propiedades de hibridación y dichas modificaciones del esqueleto también se pueden combinar con nucleótidos sustituidos o análogos nucleotídicos. Ejemplos son oligonucleótidos de fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidoato y metilfosfonato.

45 El PNA (que tiene un esqueleto sin fosfato ni d-ribosa) también se puede usar como un análogo de ADN.

Los nucleótidos modificados, análogos nucleotídicos así como modificaciones del esqueleto del oligonucleótido anteriormente mencionados se pueden combinar como se desee en un oligonucleótido en el sentido de la presente invención.

50 Los términos «polipéptido» y «proteína» se usan de forma intercambiable. Un polipéptido en el sentido de la presente invención consiste en al menos 5 aminoácidos unidos por enlaces alfa-amino-peptídicos.

55 Un «polipéptido diana» es un polipéptido de interés para el que se busca un procedimiento para determinación o medición. El polipéptido diana de la presente invención es un polipéptido que se sabe o se sospecha que forma un complejo polipeptídico homo- o heterodimérico.

60 Un «fijador monovalente» de acuerdo con la presente invención es una molécula que interactúa con el polipéptido diana en un único sitio de unión con una K_{diss} de 5×10^{-3} a 10^{-4} s. La caracterización biofísica de las propiedades de velocidad de unión cinética, respectivamente la determinación de la constante de velocidad de disociación k_d (1/s) según un modelo de Langmuir se analiza preferentemente mediante espectroscopía por resonancia de plasmones superficiales basada en biosensores. Preferentemente, se usa la tecnología Biacore™ como se describe en detalle en la sección de ejemplos.

65 Ejemplos de fijadores monovalentes son péptidos, péptidos miméticos, aptámeros, *spiegelmers*, darpinas, lectinas, proteínas con repeticiones de anquirina, dominios de tipo Kunitz, anticuerpos de dominio único (véase: Hey, T. et al., Trends Biotechnol 23 (2005) 514-522) y fragmentos monovalentes de anticuerpos.

Como es obvio para el experto en la técnica, cada fijador monovalente de acuerdo con la presente invención solo se une a un único epítipo en un polipéptido diana.

- 5 En ciertos modos de realización preferentes, el fijador monovalente es un fragmento de anticuerpo monovalente, preferentemente un fragmento monovalente derivado de un anticuerpo monoclonal.

Los fragmentos de anticuerpos monovalentes incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab'-SH (Fab'), anticuerpo de dominio único, Fv y scFv, como se proporciona a continuación.

- 10 En un modo de realización preferente, al menos uno de los fijadores monovalentes es un anticuerpo de dominio único, un fragmento Fab o un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal.

- 15 También representa un modo de realización preferente que en el agente de unión bivalente divulgado en el presente documento los fijadores monovalentes se derivan de anticuerpos monoclonales y son fragmentos Fab, o fragmentos Fab' o un fragmento Fab y un fragmento Fab'.

- 20 Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión extremadamente específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos o fragmentos de los mismos. Particularmente bien conocidos en la técnica son técnicas para crear anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, inmunizando ratones, conejos, hámsteres o cualquier otro mamífero con un polipéptido de interés. Otro procedimiento para crear anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, es el uso de genotecas de fagos de sFv (región variable monocatenaria), específicamente sFv humana. (Véase, por ejemplo, Griffiths et al., patente de EE. UU. n.º 5.885.793; McCafferty et al., documento WO 92/01047; Liming et al., documento WO 99/06587).

- 25 Pueden generarse fragmentos de anticuerpo mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática o por técnicas recombinantes. Para una revisión de algunos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

- 30 Un Fv es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión a antígeno y está desprovisto de región constante. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En un modo de realización de una especie de Fv monocatenario (scFv) un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera se pueden unir de forma covalente mediante un conector peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura dimérica análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. núms. 5.571.894 y 5.587.458. En general, seis regiones hipervariables (HVR) confieren especificidad de unión al antígeno a un anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno.

- 45 El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

- 50 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto, K. et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 (1992) 107-117; y Brennan et al., Science 229 (1985) 81-83). Por ejemplo, la digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados fragmentos «Fab», cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento «Fc» residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente.

- 55 Los fragmentos de anticuerpo también pueden ser producidos directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse en y secretarse a partir de *E. coli*, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las genotecas de fagos de anticuerpos de acuerdo con procedimientos estándar. De forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* (Carter, P. et al., Bio/Technology 10 (1992) 163-167). Los sistemas de células de mamífero también pueden usarse para expresar y, si se desea, secretar fragmentos de anticuerpos.

- 60 En ciertos modos de realización, un fijador monovalente de la presente invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertos modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis,

Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). En un modo de realización, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

- 5 Uno de los dos fijadores monovalentes, el primer fijador monovalente, se une a un epítipo en un primer polipéptido (diana).

Un «epítipo» de acuerdo con la presente invención, el sitio de unión en el polipéptido diana unido por el correspondiente fijador monovalente, se compone de aminoácidos. Los aminoácidos son aminoácidos naturales y pueden llevar una o más modificaciones secundarias. En un modo de realización, los aminoácidos no se modifican secundariamente. En un modo de realización, el fijador monovalente se une a un epítipo lineal, es decir, un epítipo que consiste en un tramo de 5 a 12 aminoácidos consecutivos, o el fijador monovalente se une a una estructura terciaria formada por la disposición espacial del polipéptido diana. Los epítipos terciarios reconocidos por un fijador, por ejemplo, por el sitio de reconocimiento del antígeno o paratopo de un anticuerpo, pueden considerarse características de superficies tridimensionales de una molécula de antígeno; estas características se ajustan con precisión (en el) al sitio de unión correspondiente del fijador y, por lo tanto, se facilita la unión entre el fijador y el polipéptido diana.

En el agente de unión bivalente como se divulga en el presente documento, el primer fijador monovalente se une a un epítipo en un primer polipéptido y el segundo fijador monovalente se une a un epítipo en un segundo polipéptido. El primer y el segundo polipéptido en un dímero polipeptídico pueden tener una secuencia idéntica, es decir, este dímero es un homodímero, o el primer y el segundo polipéptido pueden ser diferentes, es decir, este dímero es un heterodímero.

Como se ha mencionado anteriormente, para muchas moléculas de receptores la formación de un homo o heterodímero polipeptídico, respectivamente, es clave para la regulación de la transducción de señales celulares y la actividad de las proteínas. Esto es especialmente conocido y cierto para los receptores unidos a la membrana, especialmente los denominados receptores tirosina-cinásicos (RTK). Como ya sugiere la nomenclatura, al menos parte de la transducción de señales intracelulares de los RTK está mediada por el estado de fosforilación de cierta tirosina del dominio intracelular de dichos RTK. En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere, por lo tanto, a un agente de unión bivalente que se une a un dímero polipeptídico receptor. Obviamente, dicho agente de unión bivalente es de gran utilidad en la detección de polipéptidos receptores homodiméricos o heterodiméricos activos.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un agente de unión bivalente como se ha divulgado anteriormente en el presente documento, en el que el dímero polipeptídico diana se selecciona del grupo que consiste en moléculas de receptores unidos a la membrana, preferentemente de homo o heterodímeros formados por asociación de dos polipéptidos receptores tirosina-cinásicos.

En algunos modos de realización, el polipéptido RTK que es parte de un homodímero o heterodímero se selecciona del grupo que consiste en: ALK, receptor cinásico relacionado con la adhesión (por ejemplo, Axl), receptores ERBB (por ejemplo, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4), receptores hepatocelulares productores de eritropoyetina (EPH) (por ejemplo, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB5, EphB6), receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR5), Fgr, IGFIR, insulina R, LTK, M-CSFR, MUSK, receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGFR-A, PDGFR-B), RET, ROR1, ROR2, ROS, RYK, receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (por ejemplo, VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1, VEGF3), receptores tirosina-cinásicos con dominios de tipo inmunoglobulina y de tipo EGF (TIE) (por ejemplo, TIE-1, TIE-2/TEK), Tec, TYRO10, receptores de factor de crecimiento insulinoide (IGF) (por ejemplo, INS-R, IGF-IR, IR-R), receptores con dominio discoidina (DD) (por ejemplo, DDR1, DDR2), receptor para c-Met (MET), *recepteur d'origine nantais* (RON); también conocido como receptor 1 estimulante de macrófagos, Flt3 receptor tirosina-cinásico 3 similar a Fms (Flt3), receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1), receptor para c-kit (KIT o SCFR) y receptores relacionados con receptores de insulina (IRR).

En un modo de realización, el RTK que es parte de un homodímero o heterodímero se selecciona del grupo que consiste en: receptores ERBB (por ejemplo, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4), receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGFR-A, PDGFR-B) y receptores y correceptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (por ejemplo, VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1, VEGF3, neuropilina-1, neuropilina-2), receptores del factor de crecimiento insulinoide (IGF) (por ejemplo, INS-R, IGF-IR, IR-R) y receptores relacionados con receptores de insulina (IRR).

En un modo de realización, el RTK que es parte de un homodímero o heterodímero se selecciona del grupo que consiste en: receptores ERBB (por ejemplo, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4), receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGFR-A, PDGFR-B) y receptores y correceptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (por ejemplo, VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1, VEGF3, neuropilina-1, neuropilina-2), receptores del factor de crecimiento insulinoide (IGF) (por ejemplo, INS-R, IGF-IR, IR-R) y receptores

relacionados con receptores de insulina (IRR).

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un agente de unión bivalente capaz de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el agente de unión en dos fijadores monovalentes que se unen entre sí a través de un conector, en el que el primer fijador monovalente se une a un epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que el segundo fijador monovalente se une a un epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que cada fijador monovalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos y en el que dicho dímero es un dímero polipeptídico receptor seleccionado del grupo que consiste en receptores ERBB (por ejemplo, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4) y receptores y correceptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (por ejemplo, VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1, VEGF3, neuropilina-1, neuropilina-2).

En un modo de realización, la homodimerización y/o heterodimerización del receptor se refiere a los polipéptidos implicados en la transducción de señales del VEGF. Incluye los factores de crecimiento del endotelio vascular y sus receptores correspondientes como un ejemplo específico (para detalles completos véase Otrack, Z. et al., Blood Cells, Molecules and Diseases: 38 (2007) 258-268).

La transducción de señales del VEGF a menudo representa una etapa crítica que limita la velocidad en la angiogénesis fisiológica. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Este proceso es importante para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo fetal y la reparación tisular; sin embargo, la angiogénesis no controlada promueve las enfermedades neoplásicas y otros trastornos. La implementación fructífera de este proceso depende del equilibrio entre los factores que estimulan el crecimiento y los factores inhibidores del crecimiento. Uno de los reguladores de la angiogénesis más específicos y cruciales es el VEGF.

La familia VEGF comprende siete glicoproteínas secretadas que se designan como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento placentario (P1GF) y VEGF-F. Los miembros de la familia VEGF unen sus receptores análogos. Los receptores identificados hasta ahora se designan como VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y las neuropilinas (NP-1 y NP-2).

El VEGF-A ejerce su efecto biológico a través de la interacción con receptores de superficie celular. Estos receptores son receptores tirosina-cinásicos transmembranarios e incluyen el receptor 1 del VEGF (VEGFR-1; Flt-1) y el VEGFR-2 (receptor que contiene un dominio de inserto de cinasa/Flk-1), expresados selectivamente en células endoteliales vasculares, y los receptores de neuropilina (NP-1 y NP-2), expresados en el endotelio vascular y las neuronas. Tras la unión del VEGF-A al dominio extracelular del receptor, una cascada de proteínas en dirección 3' se activa después de la dimerización y autofosforilación de los receptores tirosina-cinásicos intracelulares. El VEGFR-2 parece ser el principal receptor responsable de mediar en los efectos proangiogénicos del VEGF-A.

El VEGFR-1 (tirosina-cinasa similar a Fms; Flt-1) se compone de siete dominios de homología a la inmunoglobulina (Ig) extracelulares, una única región transmembranaria y un dominio tirosina-cinasa intracelular. El VEGFR-1 se une a VEGF-A, VEGF-B y P1GF con alta afinidad.

El VEGFR-2 (KDR, humano, Flk-1, ratón) se aisló por primera vez en 1991 y se denominó receptor que contiene un dominio de inserto de cinasa (KDR). Al igual que el VEGFR-1, el VEGFR-2 posee una región extracelular con siete dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembranario y un dominio tirosina-cinasa con un inserto de aproximadamente 70 aminoácidos. El VEGFR-2 se une a VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E.

El VEGFR-3 (tirosina-cinasa 4 similar a Fms, Flt4), un miembro de los receptores tirosina-cinásicos de las células endoteliales, tiene solo seis dominios de homología a Ig [121]. El VEGFR-3 se une preferentemente a VEGF-C y VEGF-D.

Los receptores de VEGF 1, 2 y 3 al unirse al ligando pueden formar homodímeros que son activos y ejercen sus efectos a través del dominio tirosina-cinasa intracelular. Sin embargo, la formación de homodímeros no es la única forma de acción y las llamadas neuropilinas desempeñan un papel importante como correceptores.

La neuropilina NP-1 se identificó inicialmente como una glicoproteína de superficie celular de 130 a 140 kDa que servía como receptor para la semaforina/colapsinas, una gran familia de proteínas secretadas y transmembranarias que sirven como señales de guiado de acción repelente en el desarrollo axonal y neuronal. La NP-1 se une a VEGF-A, VEGF-B y P1GF, mientras que la NP-2 se une a VEGF-A, VEGF-C y P1GF.

La NP-1 actúa como un correceptor que potencia las interacciones de VEGF-A-VEGFR-2, forma complejos con VEGFR-1 y estimula la angiogénesis tumoral *in vivo*. Para investigar esta ruta, se requiere la detección específica de un heterodímero VEGFR-2/NP-1.

Estudios recientes han relacionado la NP-2 con el desarrollo de vasos linfáticos.

Como se ha señalado anteriormente, los miembros de la familia de receptores de VEGF, siempre que sean monoméricos, no son activos: sin embargo, tras la unión al ligando y la homo y/o heterodimerización, se inducen una serie de diferentes rutas bioquímicas que dan lugar a diferentes mecanismos de acción. La capacidad de diferenciar entre monómeros (inactivos) y los diversos homo- y/o heterodímeros es de suma importancia para dilucidar el mecanismo de acción fisiológico del sistema de VEGF/receptores de VEGF y el efecto de fármacos dirigidos a uno o más miembros de este sistema. En un modo de realización, la presente invención se refiere a un agente de unión bivalente de acuerdo con la invención, siendo capaz el agente de unión bivalente de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el agente de unión en dos fijadores monovalentes que se unen entre sí a través de un conector, en el que el primer fijador monovalente se une a un epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que el segundo fijador monovalente se une a un epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en el que cada fijador monovalente tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$, en el que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos y en el que el homo- y/o heterodímero es parte del sistema de VEGF/receptores de VEGF. En dicho fijador en un modo de realización, un fijador monovalente se une a un VEGF seleccionado del grupo que consiste en VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crecimiento placentario (P1GF) y VEGF-F y el otro fijador monovalente se une a un receptor seleccionado del grupo que consiste en VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y las neuropilinas (NP-1 y NP-2). O dicho fijador en un modo de realización tiene un fijador monovalente que se une a un polipéptido receptor seleccionado del grupo que consiste en VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 y el otro fijador monovalente se une a una neuropilina (NP-1 o NP-2).

Como se ha analizado, un fijador monovalente para uso en la construcción de un agente de unión bivalente como se divulga en el presente documento debe tener una K_{diss} de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$.

Preferentemente, el primer fijador monovalente se une específicamente a un epítipo en el primer polipéptido. Es decir, este fijador se une a un epítipo que no está presente en el segundo polipéptido diana como es el caso de un agente de unión bivalente heterodímero o se une a un epítipo que se solapa un epítipo presente en el segundo polipéptido diana o es idéntico al mismo como es el caso de un agente de unión bivalente homodímero.

Se reconoce la unión específica a un epítipo si dicho fijador tiene una K_{diss} que es al menos 20 veces menor para el epítipo en el polipéptido diana en comparación con cualquier epítipo (similar o completamente no relacionado) en cualquier otro péptido (por ejemplo, en el segundo polipéptido diana si el primer y el segundo polipéptido diana son diferentes). Se reconoce que los polipéptidos en un heterodímero son diferentes si un fijador monovalente se une específicamente a solo uno de los polipéptidos. También es preferente que la K_{diss} del primer fijador monovalente al epítipo en el primer polipéptido diana sea al menos 30, 40, 50, 80, 90, 95 o al menos 100 veces menor en comparación con cualquier epítipo en cualquier otro polipéptido.

En un modo de realización preferente, el agente de unión bivalente divulgado en el presente documento se une a un heterodímero, que comprende dos polipéptidos diferentes. En este caso, el segundo fijador monovalente se selecciona preferentemente para que tenga una K_{diss} que sea al menos 20 veces menor para el primer polipéptido en comparación con la K_{diss} para su unión con el segundo polipéptido diana. También es preferente que la K_{diss} del segundo fijador monovalente al segundo polipéptido diana sea al menos 30, 40, 50, 80, 90, 95 o al menos 100 veces menor en comparación con la K_{diss} para cualquier epítipo en el primer polipéptido diana.

Como se ha mencionado anteriormente, el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención tendrá una K_{diss} de como máximo $3 \times 10^{-5}/s$ o menor, es decir, mejor.

En un modo de realización en el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención cada fijador monovalente tiene una K_{diss} de $2 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$.

En un modo de realización en el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención cada fijador monovalente tiene una K_{diss} de $10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$.

Las máquinas automáticas de tinción inmunohistoquímica distribuidas por Ventana Medical Systems Inc. Tucson emplean condiciones de lavado bastante estrictas. Un anticuerpo utilizado en la serie de analizadores BenchMark® debe tener una K_{diss} de como máximo $5 \times 10^{-5}/s$ para dar una intensidad de tinción razonable. Cuanto más baja sea la K_{diss} , mejor será la intensidad de la tinción. El agente de unión bivalente como se divulga en el presente documento tiene una K_{diss} de como máximo $3 \times 10^{-5}/s$. En un modo de realización adicional, el agente de unión bivalente como se divulga en el presente documento tiene una K_{diss} de $2 \times 10^{-5}/s$ o menos o también preferente de $10^{-5}/s$ o menos.

En un modo de realización, las propiedades de velocidad cinética de cada fijador monovalente y del agente de unión bivalente se caracterizan por la tecnología SPR Biacore™ como se describe en detalle en los ejemplos.

El agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención contiene un conector. El conector puede enlazar de forma covalente los dos fijadores monovalentes o, de acuerdo con la invención, el conector y los fijadores monovalentes pueden unirse por dos pares de unión específicos diferentes a:a' y b:b'.

El conector puede estar compuesto, por ejemplo, de monómeros apropiados, unidos entre sí y a los dos fijadores

monovalentes por enlaces covalentes. Preferentemente, el conector puede contener restos de azúcares, restos de nucleótidos, restos de nucleósidos y/o aminoácidos. En ciertos modos de realización preferentes, el conector puede consistir esencialmente en nucleótidos, análogos de nucleotídicos o aminoácidos.

5 En aspectos como se divulgan en el presente documento, el conector que enlaza de forma covalente o, de acuerdo con la invención, que une los dos fijadores monovalentes mediante pares de unión tiene una longitud de 6 a 100 nm. También es preferente que el conector tenga una longitud de 6 a 50 nm o de 6 a 40 nm. En un modo de realización también preferente, el conector tendrá una longitud de 10 nm o mayor o de 15 nm o mayor. En un modo de realización, el conector comprendido en un agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención tiene una longitud de
10 entre 10 nm y 50 nm.

La longitud de las entidades no nucleosídicas de un conector dado (a-S-b) en teoría y mediante procedimientos complejos puede calcularse utilizando distancias entre enlaces conocidas y ángulos de enlace de compuestos que son químicamente similares a las entidades no nucleosídicas.

15 Dichas distancias entre enlaces se resumen para algunas moléculas en manuales estándar: CRC Handbook of Chemistry and Physics, 91.^a edición, 2010-2011, sección 9. Sin embargo, las distancias entre enlaces exactas varían para cada compuesto. También hay variabilidad en los ángulos de enlace.

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

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

25 El valor de 130 pm se basa en el cálculo de la distancia de los dos átomos de carbono terminales de una cadena C(sp³)-C(sp³)-C(sp³) con un ángulo de enlace de 109° 28' y una distancia de 153 pm entre dos C(sp³) que es aproximadamente 250 pm que se traduce con un supuesto ángulo de enlace de 180° y una distancia de enlace entre dos C(Sp³) con 125 pm. Teniendo en cuenta que los heteroátomos como los átomos de P y S, y C sp² y sp¹, también podrían ser parte del espaciador, se toma el valor de 130 pm. Si un espaciador comprende una estructura cíclica tal como cicloalquilo o arilo, la distancia se calcula de manera análoga, contando el número de enlaces de dicha estructura cíclica que son parte de la cadena global de átomos que están definiendo la distancia.

35 Como se ha mencionado anteriormente, el conector puede enlazar de forma covalente los dos fijadores monovalentes o, de acuerdo con la invención, el conector y los fijadores monovalentes pueden unirse por dos pares de unión específicos diferentes a:a' y b:b'. Por lo tanto, el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención, que se une a un dímero polipeptídico, también se puede representar mediante la fórmula I siguiente:

40 A - a':a - S - b:b' - B,

en la que A es un primer fijador monovalente, que se une a un epítipo de dicho primer polipéptido diana, en la que B es un segunda fijador monovalente, que se une a un epítipo de dicho segundo polipéptido diana, en la que cada fijador monovalente A y B tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$, en la que de acuerdo con la invención a':a así como b:b' son independientemente un par de unión, en la que de acuerdo con la invención a':a y b:b' son diferentes, en la que S es un espaciador, en la que - representa un enlace covalente, en la que el conector a - S - b tiene una longitud de 6 a 100 nm y en la que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-3}/s$ o menos.

50 El conector L que consiste en a - S - b tiene una longitud de 6 a 100 nm. Preferentemente, el conector L que consiste en a - S - b tiene una longitud de 6 a 80 nm. También es preferente que el conector tenga una longitud de 6 a 50 nm o de 6 a 40 nm. En un modo de realización también preferente, el conector tendrá una longitud de 10 nm o mayor o de 15 nm o mayor. En un modo de realización, el conector tiene entre 10 nm y 50 nm de longitud. En un modo de realización a y b, respectivamente, son miembros de pares de unión y tienen una longitud de al menos 2,5 nm cada uno.

55 El espaciador S puede construirse según se requiera para, por ejemplo, proporcionar la longitud deseada así como otras propiedades deseadas. El espaciador puede estar compuesto, por ejemplo, total o parcialmente de aminoácidos de origen natural o no natural, de unidades de fosfato y azúcares, por ejemplo, un esqueleto de tipo ADN sin nucleobases, de estructuras glicopeptídicas, o al menos parcialmente de unidades sacarídicas o al menos parcialmente de subunidades polimerizables como glicoles o acrilamida.

60 La longitud del espaciador S en un compuesto de acuerdo con la presente invención puede variarse según se desee. Para disponer fácilmente de espaciadores de longitud variable, es preferente que una genoteca tenga un acceso sintético simple a los espaciadores de dicha genoteca. Es preferente una síntesis combinatoria en fase sólida de un espaciador. Como los espaciadores tienen que sintetizarse hasta una longitud de aproximadamente 100 nm, la estrategia de síntesis se elige de tal manera que los bloques de construcción sintéticos monoméricos se ensamblan
65

durante la síntesis en fase sólida con alta eficacia. La síntesis de desoxioligonucleótidos basados en el ensamblaje de fosforamidita como bloques de construcción monoméricos cumple perfectamente estos requisitos. En dicho espaciador, las unidades monoméricas dentro de un espaciador se unen en cada caso a través de un resto de fosfato o de un análogo de fosfato.

5 El espaciador S puede contener grupos libres positivamente y/o negativamente cargados de ácidos aminocarboxílicos polifuncionales, por ejemplo, amino, carboxilato o fosfato. Por ejemplo, los portadores de carga se pueden derivar de ácidos aminocarboxílicos trifuncionales que contienen a) un grupo amino y dos grupos carboxilato o b) dos grupos amino y un grupo carboxilato. Ejemplos de dichos ácidos aminocarboxílicos trifuncionales son lisina, ornitina, hidroxilisina, ácido α,β -diaminopropiónico, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, ácido carboxiglutámico y ácidos carboxílicos trifuncionales simétricos como los descritos en los documentos EP-A-0 618 192 o US-A-5,519,142. De forma alternativa, uno de los grupos carboxilato en los ácidos aminocarboxílicos trifuncionales a) puede reemplazarse por un grupo fosfato, sulfonato o sulfato. Un ejemplo de dicho aminoácido trifuncional es la fosfoserina.

15 El espaciador S también puede contener grupos hidrófilos no cargados. Los ejemplos preferentes de grupos hidrófilos no cargados son grupos de óxido de etileno u óxido de polietileno preferentemente con al menos tres unidades de óxido de etileno, grupos de sulfóxido, sulfona, amida de ácido carboxílico, éster de ácido carboxílico, amida de ácido fosfónico, éster de ácido fosfónico, amida de ácido fosfórico, éster de ácido fosfórico, amida de ácido sulfónico, éster de ácido sulfónico, amida de ácido sulfúrico y éster de ácido sulfúrico. Los grupos amida son preferentemente grupos amida primarios, en particular preferentemente residuos de amida de ácido carboxílico en grupos laterales de aminoácidos, por ejemplo, los aminoácidos asparagina y glutamina. Los ésteres se derivan preferentemente de alcoholes hidrófilos, en particular alcoholes C1-C3 o dioles o trioles.

20 En un modo de realización, el espaciador S está compuesto por un tipo de monómero. Por ejemplo, el espaciador se compone exclusivamente de aminoácidos, de residuos de azúcares, de dioles, de unidades de fosfo-azúcares o puede ser un ácido nucleico, respectivamente.

25 En un modo de realización, el espaciador es ADN. En un modo de realización preferente, el espaciador es el estereoisómero L de ADN también conocido como beta-L-ADN, L-ADN o ADN de imagen especular. El L-ADN presenta ventajas como el comportamiento de hibridación ortogonal, lo que significa que un dúplex se forma solo entre dos cadenas únicas complementarias de L-ADN pero no se forma un dúplex entre una cadena única de L-ADN y la cadena de ADN complementaria, la resistencia a nucleasas y la facilidad de síntesis incluso de un espaciador largo. Como se ha señalado, la facilidad de síntesis y la variabilidad en la longitud del espaciador son importantes para una biblioteca de espaciadores. Los espaciadores de longitud variable son extremadamente útiles para identificar el fijador dual bivalente de acuerdo con la presente invención que tiene un espaciador de longitud óptima, proporcionando de este modo la distancia óptima entre los dos fijadores monovalentes.

30 Los bloques de construcción espaciadores, como su nombre indica, se pueden usar para introducir un resto de separación en el espaciador S o para construir el espaciador S del conector a-S-b.

35 Diferentes números y tipos de bloques de construcción espaciadores no nucleotídicos y nucleotídicos están disponibles para introducir restos espaciadores.

40 En la bibliografía se conocen muchos bloques de construcción espaciadores bifuncionales no nucleotídicos diferentes y existe una gran variedad disponible comercialmente. La elección de la construcción espaciadora bifuncional no nucleotídica está influyendo en la carga y la flexibilidad de la molécula espaciadora.

45 En bloques de construcción espaciadores bifuncionales, un grupo hidroxilo que está protegido con un grupo protector lábil en medio ácido se conecta a un grupo fosforamidito.

50 Los bloques de construcción espaciadores bifuncionales en un modo de realización son compuestos no nucleosídicos. Por ejemplo, dichos espaciadores son cadenas de alquilo, alquenilo, alquinilo carbono con C2-C18, mientras que dichas cadenas alquilo, alquenilo, alquinilo pueden interrumpirse por restos etilenoxi y/o amida adicionales o restos de amina catiónica cuaternizados para aumentar la hidrofilia del conector. Los restos cíclicos como cicloalquilo C5-C6, C4N, C5N, C4O, C5O-heterocicloalquilo, fenilo que están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos alquilo C1-C6 también se pueden usar como restos espaciadores bifuncionales no nucleosídicos. Los bloques de construcción bifuncionales preferentes comprenden restos alquilo C3-C6 y cadenas de tri- a hexaetilenglicoles. La tabla I muestra algunos ejemplos de bloques de construcción espaciadores bifuncionales nucleotídicos con diferente hidrofilia, diferente rigidez y diferentes cargas. Un átomo de oxígeno se conecta a un grupo protector lábil en medio ácido, preferentemente dimetoxitritilo y el otro es parte de una fosforamidita.

Tabla I: Ejemplos de bloques de construcción espaciadores bifuncionales no nucleotídicos

Bloques de construcción espaciadores bifuncionales no nucleotídicos	Referencia
	Seela, F., Nucleic Acides Research 15 (1987) 3113-3129
	Iyer, R.P., Nucleic Acids Research 18 (1990) 2855-2859
	Documento WO 89/02931 A1
	Documento EP 1 538 221
	Documento US 2004/224372
	Documento WO 2007/069092

Una manera simple de construir el espaciador S o de introducir restos espaciadores en el espaciador S es usar bloques de construcción de fosoramidita nucleosídicos D o L estándar. En un modo de realización, se usa un único tramo de cadena de dT. Esto es ventajoso, porque la dT no lleva un grupo protector de bases.

5 La hibridación se puede utilizar para variar la longitud del espaciador (distancia entre los miembros del par de unión a y b) y la flexibilidad del espaciador, porque la longitud de la doble cadena se reduce en comparación con la cadena única y la doble cadena es más rígida que una cadena única.

10 Para la hibridación en un modo de realización se usan oligonucleótidos modificados con un resto funcional X. El oligonucleótido utilizado para la hibridación puede tener una o dos extensiones terminales que no hibridan con el espaciador y/o se ramifican internamente. Dichas extensiones terminales que no están hibridando con el espaciador (y que no interfieren en los pares de unión a:a' y b:b') pueden usarse para otros eventos de hibridación. En un modo de realización, un oligonucleótido que hibrida con una extensión terminal es oligonucleótido marcado. Este
15 oligonucleótido marcado puede comprender de nuevo extensiones terminales o ramificarse para permitir una hibridación adicional, por lo que puede obtenerse un agregado de un polinucleótido o dendrímero. Preferentemente se usa un dendrímero de ácido polioligonucleico para producir un polimarcador o para obtener una alta concentración local de X.

20 En un modo de realización, el espaciador S tiene una longitud de esqueleto de 1 a 100 nm. En otras palabras, los grupos a y b de la fórmula I están separados entre 1 y 100 nm. En un modo de realización a y b, respectivamente, son cada uno un miembro de un par de unión y el espaciador S tiene una longitud de esqueleto de 1 a 95 nm.

25 «a':a» así como «b:b'» representan cada uno independientemente un par de unión, respectivamente.

«a':a» así como «b:b'» son diferentes. El término diferente indica que la unión de a con a' (unión de pares intraunión de acuerdo con la invención) no interfiere en la unión de pares intraunión del otro par b con b', y viceversa.

30 En un modo de realización separada de la invención reivindicada, «a':a» así como «b:b'» significa acoplamiento covalente. Por lo tanto, la unión de a con a' (acoplamiento covalente) no interfiere en el acoplamiento covalente del otro par b con b', y viceversa.

35 En el modo de realización separado como se divulga en el presente documento, bien a':a bien b:b' se unen de forma covalente y el otro, es decir, b:b' o a':a, respectivamente, representa un par de unión.

En un modo de realización adicional separado como se divulga en el presente documento, tanto a':a como b:b' se unen de forma covalente.

En los modos de realización separados, la química de acoplamiento entre a':a y b':b' es diferente entre sí y se selecciona de protocolos estándar. Dependiendo de la naturaleza de la pareja de unión y del espaciador, se eligen las químicas de conjugación apropiadas.

La química utilizada en el acoplamiento (a') con (a), es decir, en el acoplamiento A-(a') con un conector que comprende (a) no interfiere en la química utilizada en el acoplamiento (b) con (b'), es decir, en el acoplamiento (b')- B con un conector que comprende (b). Como apreciarán los expertos en la técnica, los sitios reactivos (a), (a'), (b) y (b'), respectivamente, dan lugar al enlace covalente a':a así como a b':b', respectivamente, preferentemente tampoco interfieren en ningún grupo funcional que pudiera estar presente en un fijador monovalente (A y/o B de fórmula I).

En el caso de que al menos uno de los fijadores monovalentes sea una proteína, un péptido o un péptido mimético, es probable que contenga uno o más grupos OH, COOH, NH₂ y/o SH, que potencialmente podrían reaccionar con ciertos reactivos de acoplamiento. Dicha reacción (lateral) puede evitarse seleccionando, por ejemplo, una de las químicas de acoplamiento dada en la tabla II.

La tabla II proporciona una visión general sobre los grupos reactivos usados rutinariamente para unir A-(a') y (b')-B, respectivamente, a (a) y (b), ambos unidos de forma covalente al conector (aSb).

Tabla II:

sitio reactivo (a') dentro de A-(a')	sitio reactivo (a) del conector L: (a)-S-(b)	sitio reactivo (b) del conector L: (a)-S-(b)	sitio reactivo (b') dentro de (b')-B
ONH ₂ (aminoxi)	C(H)=O (aldehído)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfincarboxílico	N ₃ (azida)
C(H)=O (aldehído)	ONH ₂ (aminoxi)	N ₃ (azida)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfincarboxílico
ONH ₂ (aminoxi)	C(H)=O (aldehído)	Dieno	Dienofilo
C(H)=O (aldehído)	ONH ₂ (aminoxi)	Dienofilo	Dieno
Dieno	Dienofilo	N ₃ (azida)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfincarboxílico
Dienofilo	Dieno	N ₃ (azida)	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfincarboxílico
Dienofilo	Dieno	--C≡C (alquino) o éster trifenilfosfincarboxílico	N ₃ (azida)
Dieno	Dienofilo	-C≡C (alquino) o éster trifenilfosfincarboxílico	N ₃ (azida)

Las químicas de acoplamiento bi-ortogonales anteriores son, por ejemplo, apropiadas si al menos uno de los fijadores monovalentes es un polipéptido. Si los dos agentes de unión no llevan ciertos grupos funcionales reactivos, por ejemplo, en el caso de la combinación de dos aptámeros, como los fijadores monovalentes A y B, respectivamente, hay más libertad en la selección de los sitios reactivos (a'), (a), (b) y (b'), respectivamente. Por lo tanto, además o en combinación con los pares de los sitios reactivos correspondientes dados en la tabla anterior, pueden usarse amino/éster activo (por ejemplo, éster de NHS), y SH/SH o SH/maleinimido para acoplamiento ortogonal.

Como es obvio a partir de los ejemplos anteriores, al menos uno de los enlaces covalentes entre a':a y entre b':b', respectivamente, no es un enlace alfa-amino-peptídico. También es preferente que ambos enlaces covalentes no sean enlaces alfa-amino-peptídicos.

De acuerdo con la invención, tanto a':a como b':b' son un par de unión. En consecuencia, un modo de realización de la presente invención comprende un agente de unión al menos biespecífico de la fórmula I: A - a':a - S - b':b' - B; en la que A es un primer fijador monovalente, que se une a un epítipo de un primer polipéptido diana, en la que B es un segundo fijador monovalente, que se une a un epítipo de un segundo polipéptido diana, en la que cada fijador monovalente A y B tiene una K_{diss} en el intervalo de 5 × 10⁻³/s a 10⁻⁴/s, en la que a':a así como b':b' son independientemente un par de unión, en la que de acuerdo con la invención a':a y b':b' son diferentes, en la que S es

un espaciador, en la que - representa un enlace covalente, en la que el conector a - S - b tiene una longitud de 6 a 100 nm y en la que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.

5 En este modo de realización a y a' son los miembros del par de unión a':a y b y b' son los miembros del par de unión b:b', respectivamente. Preferentemente, cada miembro de un par de unión tiene un peso molecular de 10 kD o inferior. En otros modos de realización también preferentes, el peso molecular de cada fijador de dicho par de unión es 8, 7, 6, 5 o 4 kD o inferior.

10 De acuerdo con la invención, a':a y b:b' son pares de unión y los miembros de los pares de unión a':a y b:b' son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes. De acuerdo con la invención, ambos pares de unión son secuencias de ácido nucleico hibridantes.

15 En caso de que a:a' o b':b represente un par de unión, la afinidad de unión por (dentro de) dicho par de unión es de al menos 10^8 l/mol. Ambos pares de unión son diferentes. Para un par de unión se reconoce, por ejemplo, diferencia si la afinidad por la unión recíproca, por ejemplo, la unión de a así como de a' con b o b' es un 10 % de la afinidad dentro del par a:a' o menor. También preferente, la unión recíproca, es decir, la unión de a así como de a' con b o b', respectivamente, es un 5 % de la afinidad dentro del par a:a' o menor, o si es un 2 % de la afinidad dentro de el par a:a' o menor. En un modo de realización, la diferencia es tan pronunciada que la unión recíproca (reactividad cruzada) es un 1 % o menos en comparación con la afinidad de unión específica dentro de un par de unión.

20 En un modo de realización separado de la invención reivindicada a':a y b:b' son dímeros con dominio de cremallera de leucinas. En dicho modo de realización, ambos pares de unión representan dímeros con dominio de cremallera de leucinas.

25 El término «dominio de cremallera de leucinas» se usa para denotar un dominio de dimerización comúnmente reconocido caracterizado por la presencia de un residuo de leucina en cada séptimo residuo en un tramo de aproximadamente 35 residuos. Los dominios de cremallera de leucinas son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucinas se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz, W.H. et al., Science 240 (1988) 1759-1764) y desde entonces se han encontrado en una variedad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucinas conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y los derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan. Ejemplos de dominios de cremallera de leucinas adecuados para producir proteínas multiméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucinas derivada de la proteína D tensioactiva pulmonar (SPD) descrita en Hoppe, H.J. et al., FEBS Lett. 344 (1994) 191-195.

35 Los dominios de cremallera de leucinas forman dímeros (pares de unión) unidos por una superhélice alfa-helicoidal. Una superhélice tiene 3,5 residuos por vuelta, lo que significa que cada séptimo residuo ocupa una posición equivalente con respecto al eje de la hélice. La disposición regular de leucinas dentro de la superhélice estabiliza la estructura mediante interacciones hidrófobas y de Van der Waals.

40 Si los dominios de cremallera de leucinas forman el primer par de unión (a':a) y el segundo par de unión (b:b'), ambas secuencias de cremallera de leucinas son diferentes, es decir, las secuencias a y a' no se unen a b y b'. Los dominios de cremallera de leucinas pueden aislarse a partir de proteínas naturales que se sabe que contienen dichos dominios, tales como factores de transcripción. Un dominio de cremallera de leucinas puede proceder, por ejemplo, del factor de transcripción fos y un segundo del factor de transcripción jun. Los dominios de cremallera de leucinas también se pueden diseñar y sintetizar artificialmente, usando técnicas estándar para síntesis y diseño conocidas en la técnica.

45 En un modo de realización preferente, ambos miembros de los pares de unión a':a y b:b', es decir, a, a', b y b' representan dominios de cremallera de leucinas y el espaciador S consiste en aminoácidos. En este modo de realización, la producción de la construcción a-S-b es fácilmente posible. Variar la longitud de dicho espaciador S como se desee es sencillo para un experto en la técnica. Dicho polipéptido se puede sintetizar o producir de forma recombinante.

50 Por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido espaciador fusionado a un péptido de cremallera de leucinas en el extremo N y a un péptido de cremallera de leucinas en el extremo C pueden expresarse en células hospedadoras adecuadas de acuerdo con técnicas estándar. Una secuencia de ADN que codifica un espaciador peptídico deseado puede insertarse entre una secuencia que codifica un miembro de un primer dominio de cremallera de leucinas a y en el mismo marco de lectura una secuencia de ADN que codifica un miembro de un segundo dominio de cremallera de leucinas b.

55 El espaciador S, si el conector a-S-b es un polipéptido en un modo de realización, comprende una o varias veces un motivo secuencial aminoacídico GGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 13). El espaciador S también puede comprender una secuencia de etiquetas. La secuencia de etiquetas puede seleccionarse de etiquetas de reconocimiento de proteínas usadas comúnmente tales como YPYDVPDYA (HA-Tag) (SEQ ID NO:14) o GLNDIFEAQKIEWHE (Avi-Tag) (SEQ ID NO:15).

60

De acuerdo con la invención, ambos pares de unión (a':a) y (b:b') son secuencias de ácido nucleico hibridantes.

Como ya ha indicado la nomenclatura, a y a' así como b y b' hibridan entre sí, respectivamente. Las secuencias de ácido nucleico comprendidas en a y a' por una parte y en b y b' por otra parte son diferentes. En otras palabras, las secuencias del par de unión a':a no se unen a las secuencias del par de unión b:b', respectivamente, y viceversa. En un modo de realización, la presente invención se refiere a un agente de unión al menos dual de fórmula I, en el que los pares de unión a':a' y b:b', respectivamente, son secuencias de ácido nucleico hibridantes y en el que las secuencias de ácido nucleico hibridantes de los diferentes los pares de unión a':a y b:b' no hibridan entre sí. En otras palabras, a y a' hibridan entre sí, pero no se unen a ninguno de b o b' ni interfieren en su hibridación, y viceversa. La cinética de hibridación y la especificidad de hibridación pueden controlarse fácilmente mediante análisis de punto de fusión. Se reconoce hibridación específica de un par de unión (por ejemplo, a:a') y no interferencia (por ejemplo, con b o b') si la temperatura de fusión para el par a:a' en comparación con cualquier combinación posible con b o b', respectivamente, (es decir, a:b; a:b'; a':b y a':b') es al menos 20 °C más alta.

Las secuencias de ácido nucleico que forman un par de unión, por ejemplo (a:a') o cualquier otro par de unión basado en secuencia de ácidos nucleicos pueden afectar a cualquier nucleobase natural o un análogo de la misma y pueden tener un esqueleto modificado o no modificado como se ha descrito anteriormente, siempre que sea capaz de formar un dúplex estable a través del apareamiento de bases múltiples. Estable significa que la temperatura de fusión del dúplex es superior a 37 °C. Preferentemente, la doble cadena consiste en dos cadenas únicas completamente complementarias. Sin embargo, son posibles emparejamientos incorrectos o inserciones siempre que se de una estabilidad a 37°C.

Como apreciará el experto en la técnica, un dúplex de ácido nucleico puede estabilizarse adicionalmente mediante interconexión intercatenaria. El experto en la materia conoce varios procedimientos apropiados de interconexión, por ejemplo, procedimientos que usan psoraleno o basados en tionucleósidos.

Las secuencias de ácido nucleico que representan los miembros de un par de unión preferentemente consisten en entre 12 y 50 nucleótidos. También preferente, dichas secuencias de ácido nucleico consistirán en entre 15 y 35 nucleótidos.

Las RNAsas son omnipresentes y debe tenerse especial cuidado para evitar la digestión no deseada de pares de unión y/o secuencias espaciadoras basados en ARN. Si bien es ciertamente posible usar, por ejemplo, pares de unión y/o espaciadores basados en ARN, los pares de unión y/o espaciadores basados en ADN representan un modo de realización preferente.

Las secuencias de ácido nucleico hibridantes apropiadas pueden diseñarse fácilmente para proporcionar más de dos pares de oligonucleótidos complementarios ortogonales, permitiendo una generación y uso sencillos de más de dos pares de unión. Otra ventaja de usar secuencias de ácidos nucleicos hibridantes en un agente de unión dual de la presente invención es que pueden introducirse fácilmente modificaciones en secuencias de ácidos nucleicos. Los bloques de construcción modificados están disponibles comercialmente, los cuales permiten, por ejemplo, una síntesis fácil de un conector que comprende un resto funcional. Dicho resto funcional se puede introducir fácilmente en cualquier posición deseada y en cualquiera de las estructuras a y a' así como b y b' y/o S, siempre que representen un oligonucleótido.

En un modo de realización preferente, el espaciador S comprendido en un agente de unión de acuerdo con la fórmula I es un ácido nucleico. En un modo de realización preferente, ambos pares de unión son secuencias de ácido nucleico hibridantes y el espaciador S también es un ácido nucleico. En este modo de realización, el conector L que consiste en a - S - b es un oligonucleótido.

En caso de que tanto el espaciador S como las secuencias a, a', b y b' sean todas secuencias de oligonucleótidos, es fácilmente posible proporcionar y sintetizar un solo oligonucleótido que represente al conector L que comprende S y los miembros a y b de los pares de unión a':a y b:b', respectivamente. En caso de que los fijadores monovalentes A y B, respectivamente, sean polipéptidos, cada uno de ellos puede acoplarse fácilmente a las secuencias de ácidos nucleicos que hibridan a' y b', respectivamente. La longitud del espaciador S comprendido en dicha construcción puede variarse fácilmente en cualquier manera deseada. Tomando como base las tres construcciones a-S-b, A-a' y b'-B, el agente de unión de fórmula I puede obtenerse más fácilmente de acuerdo con procedimientos estándar mediante hibridación entre a':a y b:b', respectivamente. Cuando se utilizan espaciadores de diferente longitud, las construcciones resultantes proporcionan agentes de unión duales por lo demás idénticos, pero que tienen una distancia diferente entre los fijadores monovalentes A y B. Esto permite una distancia y/o flexibilidad óptimas.

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

El L-ADN enantiomérico es conocido por su comportamiento de hibridación ortogonal, su resistencia a nucleasas y por la facilidad de síntesis de oligonucleótidos de longitud variable. Esta facilidad de variabilidad en la longitud del conector a través del diseño de espaciadores apropiados es importante para optimizar la unión de un agente de unión como se divulga en el presente documento con su antígeno o antígenos.

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

En un modo de realización, el espaciador S es un oligonucleótido y se sintetiza en dos partes que comprenden extremos hibridables entre sí. En este caso, el espaciador S se puede construir simplemente por hibridación de estos extremos hibridables entre sí. La construcción espaciadora resultante comprende una parte dúplex de oligonucleótidos. Como es obvio, en caso de que el espaciador se interprete de esta manera, la secuencia de la entidad de oligonucleótidos hibridables que forma dicho dúplex se elige de tal manera que no puede producirse hibridación ni interferencia con los pares de unión a:a' y b:b'.

Como se ha indicado anteriormente, el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención en un modo de realización se une a un homodímero polipeptídico. En caso de que los dos polipéptidos diana formen un homodímero, es preferente usar el mismo fijador monovalente dos veces. En un modo de realización, la presente invención se refiere a un agente de unión bivalente capaz de unirse a un homodímero proteico de acuerdo con la fórmula I, en la que S es un espaciador polinucleotídico en el que el fijador monovalente A se une a un primer polipéptido diana, en la que el segundo fijador monovalente (habitualmente B) es también A y se une a un segundo polipéptido diana, en la que a':a y b:b' representan ambos un par de unión de polinucleótidos. Como es obvio para el experto en la técnica, el epítipo unido por el fijador monovalente A debe estar presente solo una vez en el polipéptido diana o los epítipos reconocidos por dos fijadores monovalentes A y B, respectivamente, deben estar presentes solo una vez y deben solaparse para evitar la unión de los dos fijadores monovalentes en un único polipéptido diana monomérico. En un modo de realización, el agente de unión bivalente se une a un homodímero y ambos fijadores monovalentes se unen a un epítipo solapante. En un modo de realización, el agente de unión bivalente se une a un homodímero y ambos fijadores monovalentes se unen al mismo epítipo.

En caso de que el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención se una a un homodímero polipeptídico, también puede usarse una forma simplificada para construir dicho agente de unión bivalente. En este modo de realización, el fijador monovalente A puede acoplarse a solo una especie única de un polinucleótido hibridable (a') y el conector puede construirse para proporcionar dos extremos, cada uno hibridable con la construcción A-a'. En este modo de realización, el conector puede ser de la forma a-S-a. En el ejemplo dado en el presente documento, dicho conector especial se ha denominado adaptador.

Como se ha mencionado, en un modo de realización, el espaciador S es un oligonucleótido y se sintetiza en dos partes que comprenden extremos hibridables entre sí. En este caso, el espaciador S puede construirse simplemente hibridando estos extremos hibridables entre sí y la construcción espaciadora resultante comprende una parte dúplex de oligonucleótidos.

Como se ha indicado anteriormente, el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención en un modo de realización se une a un heterodímero polipeptídico. En caso de que los dos polipéptidos diana formen un heterodímero, es preferente usar dos pares de unión diferentes a':a y b:b', respectivamente. En un modo de realización, la presente invención se refiere a un agente de unión bivalente de acuerdo con la fórmula I, en el presente documento S es un espaciador polinucleotídico en el que el fijador monovalente A se une a un primer polipéptido diana, en el que el segundo fijador monovalente B se une a un segundo polipéptido diana, en el que A y B se unen específicamente al primer y al segundo polipéptido diana, respectivamente, en el que a':a y b:b' representan ambos un par de unión de polinucleótidos, en el que a':a y b:b' no se unen ni interfieren entre sí.

Como ya se ha descrito anteriormente, los fijadores específicos monovalentes A y B de fórmula I pueden ser ácidos nucleicos. En un modo de realización de la presente invención, a', a, b, b', A, B y S son todas secuencias de oligonucleótidos. En este modo de realización, las subunidades A-a', a-S-b y b'-B de fórmula I pueden sintetizarse fácil e independientemente de acuerdo con procedimientos estándar y combinarse por hibridación de acuerdo con procedimientos estándar convenientes.

Como se ha analizado en detalle anteriormente, el acoplamiento puede ser covalente o puede ser a través de pares de unión específicos.

Como apreciará fácilmente el experto en la técnica, el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención puede modificarse además para portar uno o más restos funcionales. Dicho resto funcional X se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un grupo de unión, un grupo marcador, un grupo efector y un grupo reactivo.

Si está presente más de un resto funcional X, cada uno de dichos restos funcionales puede ser en cada caso independientemente un grupo de unión, un grupo marcador, un grupo efector o un grupo reactivo.

En un modo de realización, el resto funcional X se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un grupo de

unión, un grupo marcador y un grupo efector.

En un modo de realización, el grupo X es un grupo de unión. Como es obvio para una persona experta en la técnica, el grupo de unión X se seleccionará para que no tenga interferencia con los pares a':a y b:b'.

Los ejemplos de grupos de unión son las parejas de un par de unión con bioafinidad que puede interactuar específicamente con la otra pareja del par de unión con bioafinidad. Los pares de unión con bioafinidad adecuados son hapteno o antígeno y anticuerpo; biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina y avidina o estreptavidina; azúcar y lectina, oligonucleótido y oligonucleótido complementario, receptor y ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroidea y hormona esteroidea. En un modo de realización, X es un grupo de unión y se une de forma covalente a al menos uno de a', a, b, b' o S del compuesto de fórmula I. Preferentemente, la pareja más pequeña de un par de unión con bioafinidad, por ejemplo, biotina o un análogo a la misma, un ligando-receptor, un hapteno o un oligonucleótido se une de forma covalente a al menos uno de a', a, S, b o b' como se ha definido anteriormente.

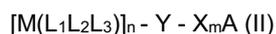
En un modo de realización, el resto funcional X es un grupo de unión seleccionado de hapteno; biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina; oligonucleótido y hormona esteroide

En un modo de realización, el resto funcional X es un grupo reactivo. El grupo reactivo puede seleccionarse de cualquier grupo reactivo conocido, como amino, sulfhidrilo, carboxilato, hidroxilo, azido, alquileno o alqueno. En un modo de realización, el grupo reactivo se selecciona de maleinimido, succinimidilo, ditiopiridilo, nitrofeniléster, hexafluorofeniléster.

En un modo de realización, el resto funcional X es un grupo marcador. El grupo marcador puede seleccionarse de cualquier grupo detectable conocido. El experto en la materia elegirá el número de marcadores que considere apropiados para una mejor sensibilidad con una extinción de fluorescencia mínima.

El grupo marcador puede seleccionarse de cualquier grupo detectable conocido. En un modo de realización, el grupo marcador se selecciona de colorantes como grupos marcadores luminiscentes tales como grupos quimioluminiscentes, por ejemplo, ésteres de acridinio o dioxetanos o colorantes fluorescentes, por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y los derivados de las mismas, complejos metálicos luminiscentes tales como complejos de rutenio o europio, enzimas como se usan para CEDIA (inmunoensayo de donador enzimático clonado, por ejemplo, documento EP 0 061 888), micropartículas o nanopartículas, por ejemplo, partículas de látex o soles metálicos y radioisótopos.

En un modo de realización, el grupo marcador es un complejo metálico luminiscente y el compuesto tiene una estructura de la fórmula general (II):



en la que M es un catión metálico divalente o trivalente seleccionado de iones de metales de tierras raras o de transición, L₁, L₂ y L₃ son iguales o diferentes y denotan ligandos con al menos dos heterociclos que contienen nitrógeno en los que L₁, L₂ y L₃ se unen al catión metálico mediante átomos de nitrógeno, X es un grupo funcional reactivo que se une de forma covalente a al menos uno de los ligandos L₁, L₂ y L₃ a través de un conector y, n es un número entero de 1 a 10, preferentemente 1 a 4, m es 1 o 2 y preferentemente 1 y A denota el contraión que puede requerirse para igualar la carga.

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

Los ligandos L₁, L₂ y L₃ son ligandos con al menos dos heterociclos que contienen nitrógeno. Son preferentes heterociclos aromáticos tales como bupiridilo, bupirazilo, terpiridilo y fenantrolilo. Los ligandos L₁, L₂ y L₃ se seleccionan en particular preferentemente de sistemas de anillos de bupiridina y fenantrolina.

El complejo puede contener adicionalmente uno o varios contraiones A para igualar la carga. Ejemplos de contraiones cargados negativamente adecuados son halogenuros, OH⁻, carbonato, alquilcarboxilato, por ejemplo, grupos trifluoroacetato, sulfato, hexafluorofosfato y tetrafluoroborato. Los grupos hexafluorofosfato, trifluoroacetato y tetrafluoroborato son particularmente preferentes. Ejemplos de contraiones cargados positivamente adecuados son cationes monovalentes tales como iones de metales alcalinos y de amonio.

En un modo de realización preferente adicional, el resto funcional X es un grupo efector. Un grupo efector preferente

es una sustancia terapéuticamente activa.

Las sustancias terapéuticamente activas tienen diferentes formas en que son eficaces, por ejemplo, en la inhibición del cáncer. Pueden dañar la plantilla de ADN por alquilación, por interconexión o por escisión de la doble cadena del ADN. Otras sustancias terapéuticamente activas pueden bloquear la síntesis de ARN por intercalación. Algunos agentes son venenos fusiformes, como alcaloides de la vinca, o antimetabolitos que inhiben la actividad enzimática, o agentes hormonales y antihormonales. El grupo efector X se puede seleccionar de agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, agentes hormonales y antihormonales y toxinas.

Los agentes alquilantes actualmente más preferentes pueden ejemplificarse con ciclofosfamida, clorambucilo, busulfano, melfalano, tiotepa, ifosfamida, mecloretamina.

Los antimetabolitos actualmente más preferentes pueden ejemplificarse con metotrexato, 5-fluorouracilo, citarabina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina.

Los antibióticos antitumorales actualmente más preferentes pueden ejemplificarse con doxorubicina, daunorubicina, idorubicina, nimitoxantrona, dactinomomicina, bleomicina, mitomicina y plicamicina.

Los venenos fusiformes actualmente más preferentes pueden ejemplificarse con maitansina y maitansinoides; los alcaloides de vinca y epipodofilotoxinas pueden ejemplificarse por vincristina, vinblastina, vindestina, etopósido, tenipósido.

Las nitrosoureas actualmente más preferentes pueden ejemplificarse con carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina.

Los agentes hormonales y antihormonales actualmente más preferentes pueden ejemplificarse con adrenocorticoides, estrógenos, antiestrógenos, progestinas, inhibidores de la aromatasa, andrógenos, antiandrógenos.

Los agentes sintéticos al azar preferentes adicionales pueden ejemplificarse con dacarbazina, hexametilmelamina, hidroxiaurea, mitotano, procarbazona, cisplatin, carboplatino.

Un resto funcional X se une de forma covalente o mediante un par de unión adicional, por ejemplo, a al menos uno de (a'), (a), (b), (b') o S. El resto funcional X puede aparecer una vez o varias (n) veces. (n) es un número entero y 1 o más de uno. Preferentemente (n) está entre 1 y 100. También preferente (n) es 1-50. En ciertos modos de realización, n es 1 a 10, o 1 a 5. En modos de realización adicionales, n es 1 o 2.

Para la unión covalente del resto funcional X a al menos uno de a', a, b, b' o S, puede usarse cualquier química de acoplamiento apropiada. El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente dicha química de acoplamiento a partir de protocolos estándar. También es posible incorporar un resto funcional mediante el uso de bloques de construcción apropiados cuando se sintetizan a', a, b, b' o S.

En un modo de realización preferente, el resto funcional X se une a a, b o S del agente de unión como se define por la fórmula I.

En un modo de realización preferente, el resto funcional X se une al espaciador S del agente de unión como se define por la fórmula I.

En un modo de realización preferente, el resto funcional X se une de forma covalente a a, b, o S del agente de unión como se define por la fórmula I.

Si un resto funcional X se localiza dentro de un oligonucleótido que hibrida que representa a, a', b o b', respectivamente, preferentemente dicho resto funcional se une a un nucleótido modificado o se une al átomo de P internucleosídico (documento WO 2007/059816) Los nucleótidos modificados que no interfieren en la hibridación de oligonucleótidos se incorporan en esos oligonucleótidos. Dichos nucleótidos modificados son preferentemente pirimidinas sustituidas en C5 o 7 deaza-purinas sustituidas en C7.

Los oligonucleótidos pueden modificarse internamente o en el extremo 5' o 3' con entidades no nucleotídicas que se usan para la introducción del resto funcional. Preferentemente, dichas entidades no nucleotídicas se localizan dentro del espaciador S, es decir, entre los dos miembros del par de unión a y b.

En la bibliografía se conocen muchos bloques de construcción modificadores no nucleotídicos diferentes para la construcción de un espaciador y existe una gran variedad disponible comercialmente. Para la introducción de un resto funcional, bloques de construcción modificadores bifuncionales no nucleosídicos o bloques de construcción modificados trifuncionales no nucleosídicos se usan como CPG para el marcado terminal o como fosforamida para

el marcado interno (véase: Wojczewski, C. et al., Synlett 10 (1999) 1667-1678).

Bloques de construcción modificadores bifuncionales

5 Los bloques de construcción modificadores bifuncionales conectan un resto funcional o, si es necesario, un resto funcional protegido a un grupo de fosoramidita para unir el bloque de construcción en el extremo 5' (síntesis regular) o en el extremo 3' (síntesis invertida) al grupo hidroxilo terminal de una cadena de oligonucleótidos en crecimiento.

10 Los bloques de construcción modificadores bifuncionales son preferentemente compuestos no nucleosídicos. Por ejemplo, dichos bloques de construcción modificados son cadenas de alquilo, alquenilo, alquinilo carbono con C2-C18, mientras que dichas cadenas de alquilo, alquenilo, alquinilo pueden interrumpirse por restos etilenoxy y/o amida adicionales para aumentar la hidrofilia del espaciador y, por lo tanto, de toda la estructura del conector. Los restos cíclicos como C5-C6-cicloalquilo, C4N, C5N, C4O, C5O-heterocicloalquilo, fenilo que están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos alquilo C1-C6 también pueden usarse como bloques de construcción modificados bifuncionales no nucleosídicos. Los bloques de construcción bifuncionales modificados preferentes comprenden restos alquilo C3-C6 y cadenas de tri- a hexaetilenglicoles. Ejemplos no limitativos, pero preferentes de bloques de construcción modificadores bifuncionales se dan en la tabla III a continuación.

20 **TABLA III:**

Bloque de construcción modificador no nucleosídico bifuncional	Introducción de	Referencia
		<p>Pon, R.T., Tetrahedron Letters 32 (1991) 1715-1718</p> <p>Theisen, P. et al., Nucleic Acids Symposium Series (1992), 27 (Nineteenth Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 1992), 99-100</p> <p>Documento EP 0 292 128</p>
		Documento EP 0 523 978
		Meyer, A. et al., Journal of Organic Chemistry 75 (2010) 3927-3930
		Morocho, A.M. et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 22 (2003) 1439-1441
		Cocuzza, A.J., Tetrahedron Letters 30 (1989) 6287-6290

Bloques de construcción modificadores trifuncionales

25 Los bloques de construcción trifuncionales conectan (i) un resto funcional o - si es necesario - un resto funcional protegido, (ii) un grupo de fosoramidita para acoplar el indicador o el resto funcional o - si es necesario - un resto funcional protegido, durante la síntesis de oligonucleótidos con un grupo hidroxilo de la cadena de oligonucleótidos en crecimiento y (iii) un grupo hidroxilo que está protegido con un grupo protector lábil en medio ácido preferentemente con un grupo protector dimetoxitritilo. Después de la eliminación de este grupo protector lábil en medio ácido, se libera un grupo hidroxilo que puede reaccionar con otras fosoramiditas. Por lo tanto, los bloques de construcción trifuncionales permiten el posicionamiento de un resto funcional en cualquier ubicación dentro de un oligonucleótido.

30 Los bloques de construcción trifuncionales también son un requisito para la síntesis usando soportes sólidos, por ejemplo, vidrio de poro controlado (CPG), que se usan para el marcado en el extremo 3' de los oligonucleótidos. En este caso, el bloque de construcción trifuncional se conecta a un resto funcional o, si es necesario, un resto funcional protegido a través de cadenas de alquilo alquilo, alquenilo, alquinilo carbono en C2-C18, mientras que dichas cadenas de alquilo, alquenilo, alquinilo pueden interrumpirse por restos etilenoxy y/o amida adicionales para aumentar la hidrofilia del espaciador y, por lo tanto, de la estructura conectora completa y comprende un grupo hidroxilo que se une a través de un espaciador escindible a una fase sólida y un grupo hidroxilo que se protege con un grupo protector lábil en medio ácido. Después de la eliminación de este grupo protector, se libera un grupo hidroxilo que podría

35

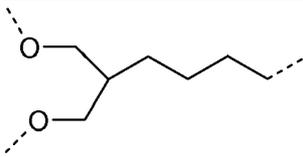
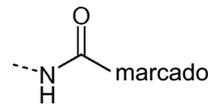
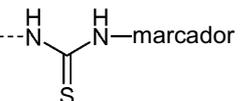
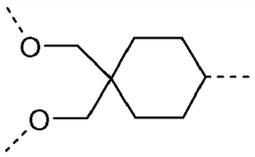
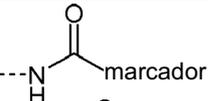
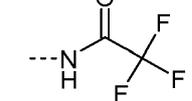
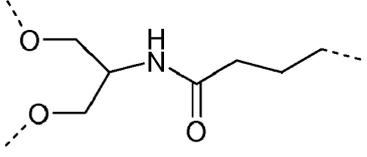
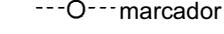
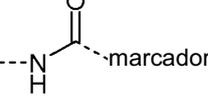
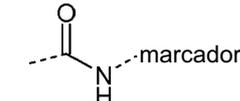
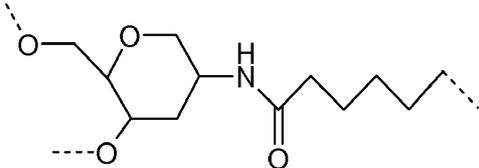
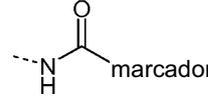
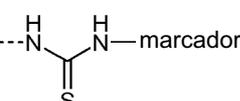
reaccionar a continuación con una fosforamidita.

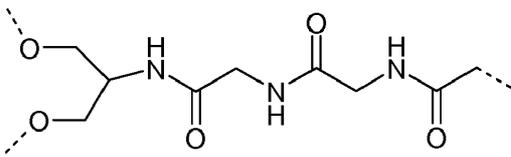
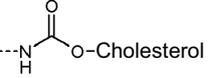
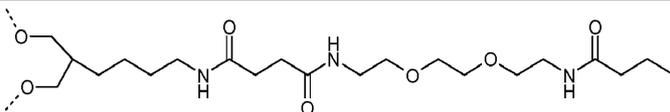
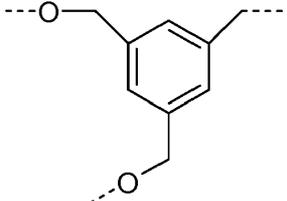
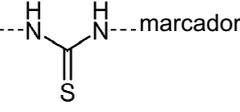
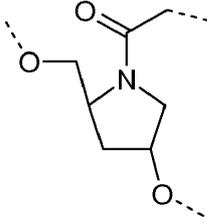
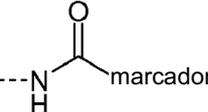
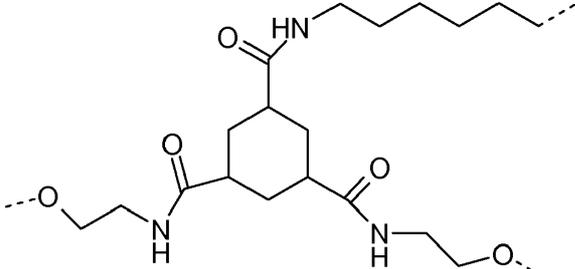
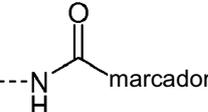
Los bloques de construcción trifuncionales pueden ser no nucleosídicos o nucleosídicos.

- 5 Los bloques de construcción trifuncionales no nucleosídicos son cadenas de alquilo, alquenilo, alquinilo en C2-C18, mientras que dichos alquilo, alquenilo, alquinilo se interrumpen opcionalmente por restos etilenoxi y/o amida adicionales para aumentar la hidrofilia del espaciador y, por lo tanto, de toda la estructura conectora. Otros bloques de construcción trifuncionales son grupos cíclicos como C5-C6-cicloalquilo, C4N, C5N, C4O, C5O-heterocicloalquilo, fenilo que están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos alquilo C1-C6. Los grupos cíclicos y acíclicos pueden estar sustituidos con un grupo (C1-C18)alquil-O-PG, mientras que dicho alquilo C1-C18 comprende restos (etilenoxi)_n, (amida)_m con n y m independientemente uno del otro = 0-6 y PG es un grupo protector lábil en medio ácido. Los bloques de construcción trifuncionales preferentes son alquilo C3-C6, cicloalquilo, restos C5O-heterocicloalquilo que comprenden opcionalmente un enlace amida y sustituidos con un grupo alquilo C1-C6 O-PG, en el que PG es un grupo protector lábil en medio ácido, preferentemente monometoxitritilo, dimetoxitritilo, pixilo, xantilo, más preferente dimetoxitritilo.

Los ejemplos no limitantes, pero preferentes, para bloques de construcción trifuncionales no nucleosídicos se resumen, por ejemplo, en la tabla IV.

20 **TABLA IV: Ejemplos de bloques de construcción modificadores trifuncionales no nucleosídicos**

Trifuncional	Introducción de	Referencia
	 	<p>Nelson, P.S. et al., Nucleic Acids Research 20 (1992) 6253-6259</p> <p>Documento EP 0 313 219; documento US 5.585.481; documento US 5.451.463; documento EP 0 786 468; documento WO 92/11388; documento WO 89/02439</p>
	 	<p>Su, S.-H. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7 (1997) 1639-1644</p> <p>Documento WO 97/43451</p>
	  	<p>Putnam, W.C. et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids 24 (2005) 1309- 1323</p> <p>Documento US 2005/214833; documento EP 1 186 613</p>
	 	<p>Documento EP 1 431 298</p>
		Documento WO 94/04550

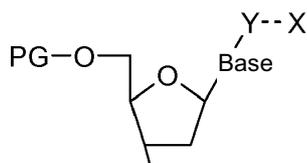
Trifuncional	Introducción de	Referencia
		Huynh, V. et al., Nucleic Acids Symposium Series (1993), 29 (Second International Symposium on Nucleic Acids Chemistry), 19-20
		Documento WO 2003/019145
		Behrens, C. y Dahl, O., Nucleosides & Nucleotides 18 (1999) 291-305 Documento WO 97/05156
		Prokhorenko, I.A. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 5 (1995) 2081-2084 Documento WO 2003/104249
		Documento US 5.849.879

Bloques de construcción modificadores nucleosídicos:

5 Los bloques de construcción modificadores nucleosídicos se usan para marcado interno siempre que sea necesario no influir en las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos en comparación con un oligonucleótido no modificado. Por lo tanto, los bloques de construcción nucleosídicos comprenden una base o un análogo de una base que todavía es capaz de hibridar con una base complementaria. La fórmula general de un compuesto marcador para marcar una secuencia de ácidos nucleicos de uno o más de a, a', b, b' o S comprendidos en un agente de unión de acuerdo con la fórmula I de la presente invención se da en la fórmula II.

10

Fórmula II



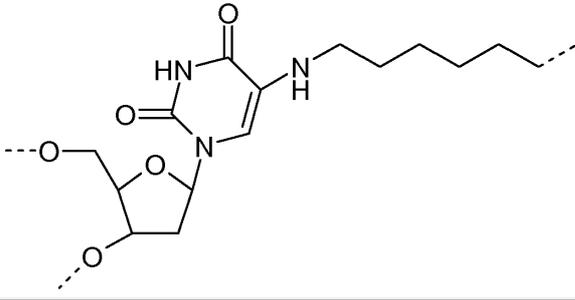
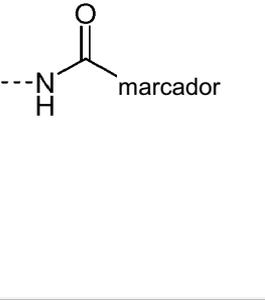
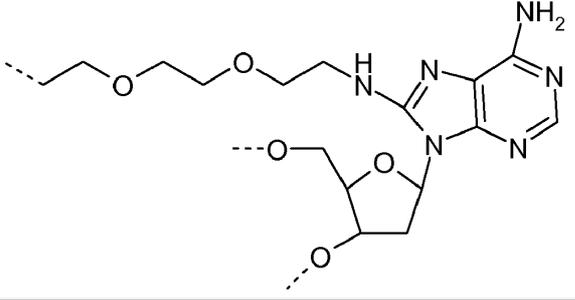
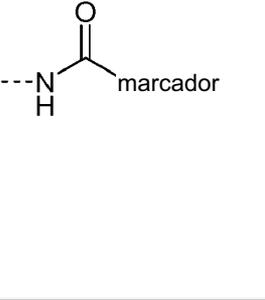
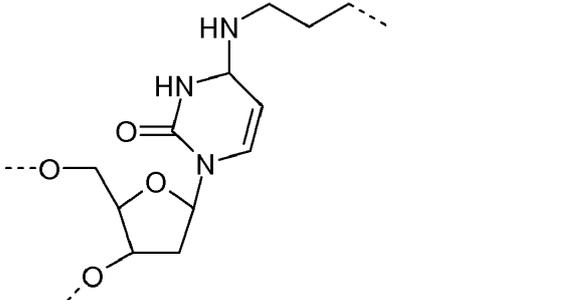
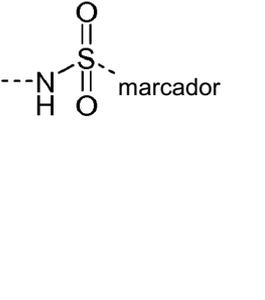
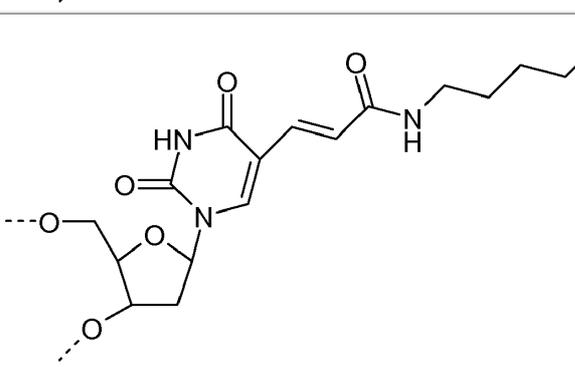
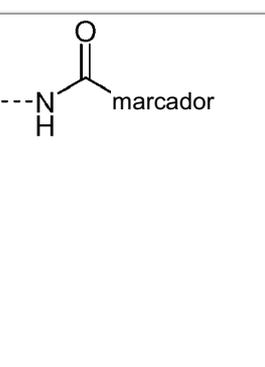
Soporte sólido de fosforamida o succinilo

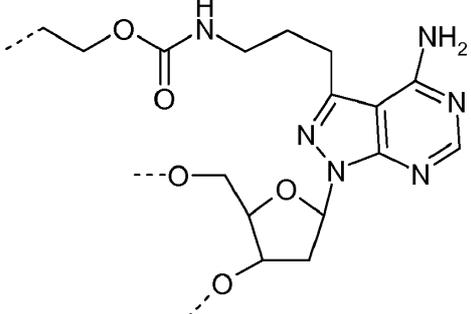
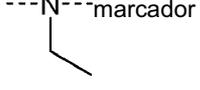
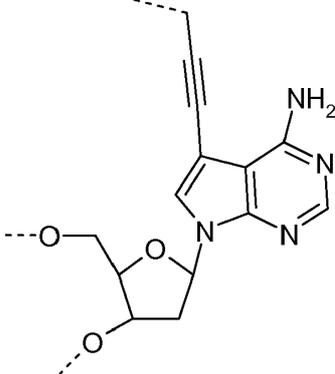
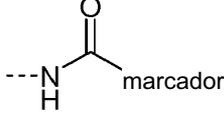
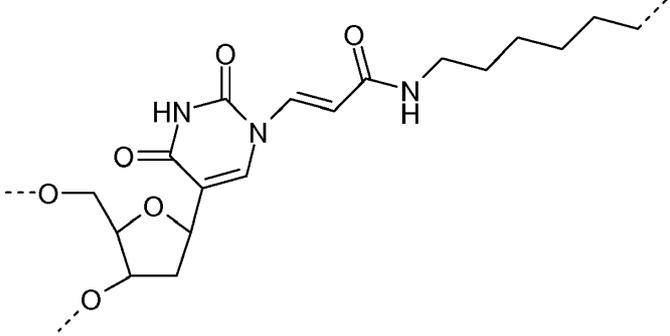
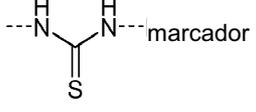
15 en la que PG es un grupo protector lábil en medio ácido, preferentemente monometoxitritilo, dimetoxitritilo, pixilo, xantilo, más preferente dimetoxitritilo, en la que Y es alquilo, alquenilo, alquinilo C2-C18, en la que dicho alquilo, alquenilo, alquinilo puede comprender restos etilenoxi y/o amida, en la que Y preferentemente es alquilo, alquenilo o

alquinilo C4-C18 y contiene un resto amida y en la que X es un resto funcional al que puede unirse un marcador.

- 5 Pueden elegirse posiciones específicas de la base para dicha sustitución a fin de minimizar la influencia sobre las propiedades de hibridación. Por lo tanto, son preferentes las siguientes posiciones para la sustitución: a) con bases naturales: uracilo sustituido en C5; citosina sustituida en C5 o en N4; adenina sustituida en C8 o en N6 y guanina sustituida en C8 o en N2 y b) con análogos de bases: 7 deaza A y 7 deaza G sustituidas en C7; 7 deaza 8 Aza A y 7 deaza 8 Aza G sustituidas en C7; 7 deaza Aza 2 amino A sustituido en C7; pseudouridina sustituida en N1 y formicina sustituida en N2.
- 10 Ejemplos no limitativos, pero preferentes, para bloques de construcción trifuncionales nucleosídicos se dan en la tabla V.

Tabla V:

Nucleosídico trifuncional	A	Referencia
		Roget, A. et al., Nucleic Acids Research 17 (1989) 7643-7651 Documento WO 89/12642; Documento WO 90/08156; Documento WO 93/05060
		Silva, J.A. et al., Biotecnologia Aplicada 15 (1998) 154-158
		Documento US 6.531.581 Documento EP 0 423 839
		Documento US 4,948,882; documento US 5,541,313; documento US 5,817,786

Nucleosídico trifuncional	A	Referencia
		<p>Documento WO 2001/042505</p>
		<p>McKeen, C.M. et al., Organic & Biomolecular Chemistry 1 (2003) 2267-2275</p>
		<p>Ramzaeva, N. et al., Helvetica Chimica Acta 83 (2000)1108-1126</p>

5 En las tablas III, IV y V, uno de los átomos de oxígeno terminales de un resto bifuncional o uno de los átomos de oxígeno terminales de un resto trifuncional es parte de una fosoramidita que no se muestra con todo detalle pero es evidente para el experto en la técnica. El segundo átomo de oxígeno terminal del bloque de construcción trifuncional se protege con un grupo de protección PG lábil en medio ácido, como se define para la fórmula II anterior.

10 La modificación post-sintética es otra estrategia para introducir un resto funcional unido de forma covalente en un conector o una molécula espaciadora. En este método, se introduce un grupo amino mediante el uso de bloques de construcción bifuncionales o trifuncionales durante la síntesis en fase sólida. Después de la escisión del soporte y la purificación del oligonucleótido modificado con amino se hace reaccionar con un éster activado de un resto funcional o con un reactivo bifuncional en el que un grupo funcional es un éster activo. Los ésteres activos preferentes son éster de NHS o ésteres de pentafluorofenilo.

15 La modificación post-sintética es especialmente útil para introducir un resto funcional que no es estable durante la síntesis y la desprotección en fase sólida. Son ejemplos la modificación con trifenilfosfincarboximetiléster para el ligado de Staudinger (Wang, C.C. et al., Bioconjugate Chemistry 14 (2003) 697-701), la modificación con digoxigenina o para introducir un grupo maleimido usando sulfo SMCC disponible comercialmente.

20 El resto funcional X en un modo de realización se une a al menos uno de a', a, b, b' o S a través de un par de unión adicional.

El par de unión adicional al que puede unirse un resto funcional X es preferentemente un dominio de cremallera de leucinas o un ácido nucleico que hibrida. En caso de que el resto funcional X se una a al menos uno de a', a, b, b' o S mediante un miembro de par de unión adicional, el miembro de par de unión al que X se une y los pares de unión a':a

y b:b', respectivamente, se seleccionan todos para tener especificidad diferente. Los pares de unión a:a', b:b' y el par de unión al que se une X se unen cada uno con (por ejemplo, hibridan con) su respectiva pareja sin interferir en la unión de ninguno de los otros pares de unión.

5 Acoplamiento covalente de un miembro de un par de unión a un conector monovalente

Dependiendo de la naturaleza bioquímica del fijador, están disponibles diferentes estrategias de conjugación.

En caso de que el fijador sea una proteína de origen natural o un polipéptido recombinante de entre 50 y 500 aminoácidos, existen procedimientos estándar en los manuales que describen la química para la síntesis de conjugados de proteínas, que el experto en la técnica puede seguir fácilmente (Hackenberger, C.P. and Schwarzer, D., *Angew. Chem., Int. Ed.*, 47 (2008) 10030-10074).

En un modo de realización, se usa la reacción de un resto maleimido con un residuo de cisteína dentro de la proteína. Esta es una química de acoplamiento preferente en caso de que, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab' de un anticuerpo se use como fijador monovalente. De forma alternativa en un modo de realización, se realiza el acoplamiento de un miembro de un par de unión (a' o b', respectivamente, de fórmula I) al extremo C-terminal del polipéptido fijador. La modificación C-terminal de una proteína, por ejemplo, de un fragmento Fab puede realizarse, por ejemplo, como se describe en Sunbul, M. et al., *Organic & Biomolecular Chemistry* 7 (2009) 3361-3371).

En general, la reacción específica del sitio y el acoplamiento covalente de un miembro de par de unión a un fijador polipeptídico monovalente se basan en transformar un aminoácido natural en un aminoácido con una reactividad que es ortogonal a la reactividad de los otros grupos funcionales presentes en una proteína. Por ejemplo, una cisteína específica dentro de un contexto de secuencia rara puede convertirse enzimáticamente en un aldehído (véase la ingeniería de etiqueta-proteína del aldehído de formilglicina mediante una nueva modificación postraduccional (Frese, M.-A. et al., *ChemBioChem* 10 (2009) 425-427). También es posible obtener una modificación de aminoácidos deseada utilizando la reactividad enzimática específica de ciertas enzimas con un aminoácido natural en un contexto de secuencia dado (véase, por ejemplo: Taki, M. et al., *Protein Engineering, Design & Selection* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al., *Chemistry & Biology* 15 (2008) 128-136; la formación catalizada por proteasas de enlaces C-N se utiliza en Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403; y el ligado de proteínas mediado por sortasas se emplea en Mao, H. et al., en *J. Am Chem Soc.* 126 (2004) 2670-2671 y se revisa en Proft, T., en *Biotechnol. Lett* 32 (2010) 1-10).

La reacción específica del sitio y el acoplamiento covalente de un miembro del par de unión a un fijador polipeptídico monovalente también pueden lograrse mediante la reacción selectiva de los aminoácidos terminales con reactivos modificadores apropiados.

La reactividad de una cisteína N-terminal con benzonitrilos (Ren, Hongjun et al., *Angewandte Chemie, International Edition* 48 (2009) 9658-9662) puede usarse para lograr un acoplamiento covalente específico del sitio.

El ligado químico nativa también puede depender de residuos de cisteína C-terminales (Taylor, E. et al., *Nucleic Acids and Molecular Biology* 22 (2009) 65-96).

El documento EP 1 074 563 describe un procedimiento de conjugación que se basa en la reacción más rápida de una cisteína dentro de un tramo de aminoácidos cargados negativamente con una cisteína situada en un tramo de aminoácidos cargados positivamente.

El fijador monovalente también puede ser un péptido sintético o péptido mimético. En caso de que un polipéptido se sintetice químicamente, pueden incorporarse aminoácidos con reactividad química ortogonal durante dicha síntesis (de Graaf, A.J. et al., *Bioconjugate Chemistry* 20 (2009) 1281-1295). Dado que una gran variedad de grupos funcionales ortogonales está en juego y puede introducirse en un péptido sintético, la conjugación de dicho péptido con un conector es una química estándar.

Para obtener una proteína monomarcada, el conjugado con estequiometría 1:1 puede separarse por cromatografía de otros productos de conjugación. Este procedimiento se facilita utilizando un miembro de par de unión marcado con colorante y un espaciador cargado. Mediante el uso de este tipo de miembro de par de unión marcado y altamente cargado negativamente, proteínas mono conjugadas se separan fácilmente de proteínas no marcadas y proteínas que llevan más de un conector, ya que la diferencia en la carga y peso molecular puede usarse para la separación. El colorante fluorescente es útil para purificar el agente de unión bivalente de componentes libres, como un fijador monovalente marcado.

Por lo tanto, en un modo de realización es preferente usar un miembro de par de unión (a' y/o b', respectivamente de fórmula I) que se marca con un colorante fluorescente (por ejemplo, sintetizado usando un bloque de construcción modificador bifuncional o trifuncional en combinación con bloques de construcción espaciadores bifuncionales durante la síntesis) para formar el agente de unión bivalente de la presente invención. En un modo de realización preferente, el espaciador S así como las secuencias a, a', b y b' son ADN y al menos uno de a' o b', respectivamente, se marca

con un colorante fluorescente. En un modo de realización preferente, el espaciador S así como las secuencias a, a', b y b' son ADN y tanto a' como b', respectivamente, se marcan cada uno con un colorante fluorescente diferente.

En un modo de realización, se divulga un procedimiento para producir un agente de unión bivalente que se une específicamente a un dímero polipeptídico. El procedimiento comprende las etapas de (a) seleccionar un primer fijador monovalente que se une a un primer polipéptido diana con una K_{diss} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$, (b) seleccionar un segundo fijador monovalente que se une a un segundo polipéptido diana con una K_{diss} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$, c) acoplar ambos fijadores monovalentes mediante un conector, y d) seleccionar un agente de unión bivalente que tiene un valor de K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o Menos.

Usando un procedimiento como el divulgado en la presente invención ahora es bastante fácil producir diversos agentes de unión bivalentes que comprendan cada uno un conector de diferente longitud y seleccionar aquellos agentes de unión bivalentes que tengan las propiedades de unión deseadas, es decir, un valor de K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos. La selección de un agente de unión bivalente con la K_{diss} deseada en un modo de realización se realiza mediante análisis Biacore™ como se divulga en el ejemplo 2.8.

En un modo de realización la presente invención se refiere a un procedimiento de formación de un agente de unión de acuerdo con la presente invención, en el que un primer fijador monovalente que se une a un primer polipéptido diana con una K_{diss} de entre $10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$ y se acopla a un miembro de un primer par de unión, un segundo fijador monovalente que se une a un segundo polipéptido diana con una K_{diss} de $10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$ y se acopla a un miembro de un segundo par de unión, en el que el primer y el segundo par de unión no interfieren entre sí y un conector que comprende un espaciador y los miembros del par de unión complementarios al primer y al segundo miembro del par de unión, respectivamente, se coincuban, formándose de este modo un agente de unión bivalente que tiene un valor de K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.

Como apreciará el experto en la materia, la K_{diss} es un valor dependiente de la temperatura. Lógicamente, los valores de K_{diss} tanto de los fijadores monovalentes como del agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención se determinan a la misma temperatura. Como se apreciará preferentemente, se determina un valor de K_{diss} a la misma temperatura a la que se usará el agente de unión bivalente, por ejemplo, se realizará un ensayo. En un modo de realización, los valores de K_{diss} se establecen a temperatura ambiente, es decir, a 20 °C , 21 °C , 22 °C , 23 °C , 24 °C o 25 °C , respectivamente. En un modo de realización, los valores de K_{diss} se establecen a 4 °C u 8 °C , respectivamente. En un modo de realización, los valores de K_{diss} se establecen a 25 °C . En un modo de realización, los valores de K_{diss} se establecen a 37 °C . En un modo de realización preferente, las determinaciones de K_{diss} , es decir, aquellas para cada fijador monovalente y la determinación de K_{diss} para el fijador dual se realizan a 37 °C .

En un modo de realización, el procedimiento anterior comprende además la etapa de aislar el agente de unión bivalente.

La estequiometría preferente para formar o ensamblar el agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención es 1:1:1.

En un modo de realización preferente, el procedimiento para producir un reactivo de unión bivalente de acuerdo con la presente invención hace uso de un conector de L-ADN. En un modo de realización preferente, el procedimiento para producir un reactivo de unión bivalente de acuerdo con la presente invención hace uso de dos pares de unión específica que consisten en ADN, preferentemente ADN-L, y un conector de L-ADN.

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

El agente de unión bivalente divulgado en la presente invención, si se usa en un procedimiento de tinción inmunohistoquímica, solo se une significativamente y no se lava durante las diversas etapas de incubación de dicho procedimiento si tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o mejor. Esta K_{diss} solo puede lograrse si ambos fijadores monovalentes se unen a su sitio de unión correspondiente. En caso de que solo esté presente un epítipo en uno de los dos polipéptidos diana, es decir, en caso de que los polipéptidos sean monoméricos y no diméricos, no se encontrará ninguna tinción significativa. Por lo tanto, y esto es de gran ventaja, la tinción inmunohistoquímica solo se observará si un dímero polipeptídico está presente en la muestra.

En un modo de realización preferente, la presente invención se refiere, por tanto, a un procedimiento de tinción histológica, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) proporcionar una muestra celular o tisular, (b) incubar dicha muestra con un agente de unión bivalente que consiste en dos fijadores monovalentes que se unen entre sí a través de un conector, en el que el primer fijador monovalente se une a un primer polipéptido, el segundo fijador monovalente se une a un segundo polipéptido, cada fijador monovalente tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$ y en el que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos, y (c) detectar el agente de unión bivalente, tiñendo de ese modo dicha muestra para un dímero polipeptídico de interés.

El uso de un agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención en la tinción de una muestra celular o tisular mediante un procedimiento inmunohistoquímico representa un modo de realización preferente adicional.

5 En términos más generales, la presente invención se refiere a un agente de unión bivalente que consiste en dos fijadores monovalentes que se unen entre sí a través de un conector, uniéndose dicho agente de unión a un dímero polipeptídico diana con una Kdiss que cumple los requisitos de un sistema de ensayo (automatizado) o mejor, en el que (a) el primer fijador monovalente que se une a un primer polipéptido diana con una Kdiss de al menos 10 veces por encima de (peor que) los requisitos del sistema de ensayo (automatizado), (b) el segundo fijador monovalente se une a un segundo polipéptido diana con una Kdiss de al menos 10 veces por encima de los requisitos del sistema de ensayo (automatizado), y (c) en el que el producto de los valores de Kdiss de los dos fijadores monovalentes (a) y (b) tiene al menos la Kdiss requerida por el sistema (automatizado) o menos.

15 En términos generales, se describe un procedimiento para obtener un agente de unión bivalente que se une específicamente a un dímero polipeptídico, que comprende dos polipéptidos diana, con una Kdiss que cumple al menos los requisitos mínimos de ensayo de un sistema de ensayo (automatizado) o mejor, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) seleccionar un primer fijador monovalente que se une a un primer polipéptido diana con una Kdiss de al menos 10 veces por encima de los requisitos de ensayo mínimos del sistema de ensayo (automatizado), (b) seleccionar un segundo fijador monovalente que se une a un segundo polipéptido diana con una Kdiss de al menos 10 veces por encima de los requisitos de ensayo mínimos del sistema de ensayo (automatizado), en el que el producto de los valores de Kdiss de los dos fijadores monovalentes en las etapas (a) y (b) es al menos la Kdiss requerida por el sistema (automatizado) o menos y (c) acoplar ambos fijadores monovalentes por un conector.

25 En un modo de realización, el sistema automatizado es el analizador BenchMark® distribuido por Ventana Medical Systems Inc., Tucson.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y referencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención.

30 Descripción del listado de secuencias

1. Fragmentos de anticuerpo

SEQ ID NO: 1 V_H (mAb 1.4.168):

35 QCDVKLVESG GGLVKPGGSL KLSAASGFT FSDYPMSWVR QTPEKRLEWV
ATITTTGGTYT YYPDSIKGRF TISRDNKNT LYLQMGSLQS EDAAMYCTR
VKTDLWWGLA YWQGTLVTV SA

SEQ ID NO: 2 V_L (mAb 1.4.168):

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

SEQ ID NO: 3 V_H (mAb 8.1.2):

45 EVQLQQSGPA LVKPGASVKM SCKASGFTFT SYVIHWVKQK PGQGLEWIGY
LNPNYDNTKY NEKFKGKATL TSDRSSSTVY MEFSSLTSED SAVYFCARRG
IYAYDHYFDY WQGTSLTVS S

SEQ ID NO: 4 V_L (mAb 8.1.2):

QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCSASSSVN YMYWYQKPG SSPRLLIYDT
SNLASGVPVR FSGSGSVTSY SLTISRMEAE DAATYYCQQW STYPLTFGAG
TKLELK

50 2. Secuencias de ADN monocatenario

a) ADN monocatenario de 19 mer (unido covalentemente con el extremo 3' a Fab' de MAB b antitroponina T o Fab' 8.1.2 a IGF-1R fosforilado, respectivamente)

5'-A GTC TAT TAA TGC TTC TGC-3' (SEQ ID NO: 5)

b) ADN monocatenario de 17 mer (unido covalentemente con el extremo 5' a Fab' de MAB a antitroponina T o Fab' 1.4.168 a IGF-1R, respectivamente)

5'-AGT TCT ATC GTC GTC CA-3'(SEQ ID NO: 6)

c) ADN monocatenario complementario de 19 mer (utilizado como parte de un conector)

5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-3' (SEQ ID NO: 7)

d) ADN monocatenario complementario de 17 mer (utilizado como parte de un conector)

5'- TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' (SEQ ID NO: 8)

3. Secuencias de epítomos de troponina T:

SEQ ID NO: 9 = SEQ ID NO:9 = ERAEQQRIRAEREKEUUSLKDRIEKRRRAERAE amida, en la que U representa β -alanina. (El epítomo «A» para el anticuerpo antitroponina anticuerpo a)

SEQ ID NO: 10 = SLKDRIERRRAERAEEOERAEQQRIRAEREKE amida, en la que O representa ácido amino-trioxa-octanoico. (El epítomo «B» para el anticuerpo antitroponina anticuerpo b)

4. Secuencias de epítomos de IGF-1R/IR:

SEQ ID NO: 11 = FDERQPYAHMNGGRKNERALPLPQSST; IGF-1R (1340-1366)

SEQ ID NO: 12 = YEEHIPYTHMNGGKKNRILTLPRSNPS; hIR(1355-1382)

5. Secuencias de etiquetas y conectores proteicos:

SEQ ID NO: 13 = motivo GGGGS (por ejemplo, como parte de un conector polipeptídico)

SEQ ID NO: 14 = YPYDVPDYA (HA-Tag)

SEQ ID NO: 15 = GLNDIFEAQKIEWHE (Avi-Tag)

6. Secuencias usadas para compilar el agente de unión bivalente a un homodímero polipeptídico

SEQ ID NO: 16 = ACC TGC TGC TAT CTT GA; este oligonucleótido se marcaba con FAM en el extremo 5' y para el acoplamiento modificado para portar un maleimido en el extremo 3'.

SEQ ID NO: 17 = G CAG AAG CAT TAA TAG AC- T(Biotina)-TGG ACG ACG ATA GAA CT; el oligonucleótido conector

SEQ ID NO: 18 = GTC TAT TAA TGC TTC TGC - C3 - TGG ACG ACG ATA GAA CT; el oligonucleótido adaptador

7. Secuencias utilizadas en un fijador dual a heterodímeros HER2/HER3 para uso en inmunohistoquímica

SEQ ID NO: 19 =

EFEVQLQESGGGLVQPKGSLQLSCAASGFTFNTYAMHWVRQAPGKGLEW
VARIRTESSDYATDYADSVKDRFIISRDDSQNMLYLQMNNLKSEDTAIYYC
VRSSGFDYWGQGTTLTVSSS; 7.2.32 cadena pesada de la región variable (HC)

SEQ ID NO: 20 =

DIQMTQSPSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVHDNGNTYLHWFLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFGVPDRFGGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGYYFCQGTHTVPTFGG
GTKLEIK; 7.2.32 cadena ligera de la región variable (LC)

SEQ ID NO: 21 =

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCRPSGYTFTDYNMHWVKQSHEKSLEWIG
YINPKNGIISYNQKFKDKATLTVNKSSRTAYMELRSLTSEDSAVYFCAGDY
WGQGTSTVTVSS; 4.1.43 cadena pesada de la región variable (HC):

SEQ ID NO: 22 =

DVVMQTPLSLPVLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKL
LISKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQSIHLPWTFG
GGTKLEIK; 4.1.43 cadena ligera de la región variable (LC):

SEQ ID NO: 23 = KLLPETGGGSGS; escisión para sortasas-etiqueta

SEQ ID NO: 24 =

MGLFCSHPGDPLATTMGWSCIIFLVATATGVHSEFEVQLQESGGGLVQPK
GSLQLSCAASGFTFNTYAMHWRQAPGKGLEWVARIRTESSDYATDYAD
SVKDRFIISRDDSQNMLYLQMNLLKSEDTAIYYCVRSSGFDYWGQGTTLT
VSSSKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSS
VHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKLKL(
GGGGS)_xYPYDVPDYA(GGGGS)_xGTEVQLQQSGPVLVKGASVKMSCRPS
GYTFTDYNMHWVKSHEKSLEWIGYINPKNGIISYNQKFKDKATLTVNKS
SRTAYMELRSLTSEDSAVYFCAGDYWGQGSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGS
AAQTNSMVTGCLVKGYFPPEVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS

SSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKI; HC Dual binder, $x = 1, 2, 3$ or 4 and indicates that amino acid sequence motive Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (= GGGGS or G4S) is present 1, 2, 3 or 4 times.

SEQ ID NO: 25 = WDQDPPERGAPPST; HER2 humano (1223-1236)

SEQ ID NO: 26 = PLHPVPIMPTAGTTPDEDYEYMNRRQR; HER3 humano (1242-1267)

SEQ ID NO: 27 = 5'-(Gly)₄- Aminoconector-(espaciador C3)3-AGT TCT ATC GTC GTC CA-Fluoresceína-3'; oligonucleótido de 17 mer

SEQ ID NO: 28 = 5'-Fluoresceína-AGT CTA TTA ATG CTT CTG C-(espaciador C3)3-Aminoconector-'-(Gly)₄-3'; oligonucleótido de 19 mer

Descripción de las figuras

Figura 1

Experimentos analíticos de filtración en gel que evalúan la eficacia del ensamblaje del fijador dual anti-pIGF1-R. Los diagramas a, b y c muestran el perfil de elución de los componentes del fijador dual individuales (fluoresceína-ssFab' de 1.4.168, Cy5-ssFab' de 8.1.2 y ADN de conector (T = 0); ssFab' denota un fragmento Fab' conjugado a un oligonucleótido monocatenario). El diagrama d muestra el perfil de elución después de que los 3 componentes necesarios para formar el agente de unión bivalente se hayan mezclado en una relación molar 1:1:1. La curva más gruesa (inferior) representa la absorbancia medida a 280 nm que indica la presencia de las proteínas ssFab' o el ADN conector, respectivamente. La curva superior más delgada en b) y d) (absorbancia a 495 nm) indica la presencia de fluoresceína y la curva superior más delgada en a) y la curva media en d) (absorbancia a 635 nm) indica la presencia de Cy5. La comparación de los volúmenes de elución de los componentes del fijador dual individuales ($VE_{ssFab' 1.4.168} \sim 15$ ml; $VE_{ssFab' 8.1.2} \sim 15$ ml; $VE_{conector} \sim 16$ ml) con el volumen de elución de la mezcla de reacción ($VE_{mezcla} \sim 12$ ml) demuestra que la reacción del ensamblaje del fijador dual fue exitosa (tasa de rendimiento: ~ 90 %). El pico principal a 280 nm que representa el fijador dual eluido se solapa perfectamente con los picos principales en el canal de 495 nm y 635 nm, lo que demuestra la presencia tanto de ssFab' de 8.1.2 como de ssFab' de 1.4.168 en el pico que representa el agente de unión bivalente.

Figura 2

Esquema del experimento Biacore™. Esquemática y ejemplarmente, se muestran dos moléculas de unión en solución: La T0-T-Dig (conector 16), agente de unión bivalente y la T40-T-Dig (conector 15), agente de unión bivalente. Estos dos agentes de unión bivalentes solo difieren en la longitud de su conector (una T digoxigenizada central sin T adicional frente a 40 Ts adicionales (20 en cada lado de la T-Dig central), entre las dos secuencias de ácido nucleico hibridantes). Además, se usaron los fragmentos ssFab' 8.1.2 y 1.4.168.

Figura 3

Sensograma Biacore™ con un diagrama de superposición de tres cinéticas que muestra la interacción de agente de unión bivalente 100 nM (que consiste en ssFab' 8.1.2 y ssFab' 1.4.168 hibridados en el conector de ADN monocatenario de T40-T-Dig, es decir, el conector 15) con el péptido inmovilizado pIGF-1R en comparación con las características de unión de ssFab' de 1.4.168 100 nM o ssFab' de 8.1.2 100 nM al mismo péptido. El rendimiento de unión más elevado se obtiene con la construcción del fijador dual, que muestra claramente que el efecto de unión

cooperativa del fijador dual aumenta la afinidad frente al péptido diana pIGF-1R.

Figura 4

5 Sensograma Biacore™ con un diagrama de superposición de tres cinéticas que muestra las interacciones del agente de unión bivalente que consiste en ssFab' de 8.1.2 y ssFab' de 1.4.168 hibridados en el conector de ADN monocatenario de T40-T-Dig, es decir, el conector 15, con péptidos inmovilizados pIGF-1R (IGF-1R fosforilado), IGF-1R o pIR (receptor de insulina fosforilado). El rendimiento de unión más elevado se obtiene con el péptido pIGF-1R, que muestra claramente que el efecto de unión cooperativa del fijador dual aumenta la especificidad frente al péptido diana pIGF-1R en comparación con, por ejemplo, el péptido receptor de insulina fosforilado (pIR).

Figura 5

15 Sensograma Biacore™ con un diagrama de superposición de dos cinéticas que muestra las interacciones del agente de unión bivalente 100 nM que consiste en ssFab' de 8.1.2 y ssFab' de 1.4.168 hibridados en el conector de ADN monocatenario de T40-T-Dig, es decir, el conector 15, y una mezcla de ssFab' de 8.1.2 100 nM o ssFab' de 1.4.168 100 nM sin ADN conector. El mejor rendimiento de unión solo se obtiene con el agente de unión bivalente, mientras que la mezcla de los ssFab' sin conector no muestra un efecto de unión cooperativa observable, a pesar del hecho de que la concentración total de estos ssFab' había sido de 200 nM.

Figura 6

25 Dibujo esquemático de un ensayo tipo sándwich Biacore™. Este ensayo se ha usado para investigar la accesibilidad del epítipo para ambos anticuerpos sobre el péptido IGF-1R fosforilado. <MlgGFcy>R presenta un anticuerpo de conejo anti-ratón usado para capturar el anticuerpo murino M-1.4.168. M-1.4.168 se usa a continuación para capturar el péptido pIGF-1R. M-8.1.2 finalmente forma el sándwich que consiste en M-1.4.168, el péptido y M-8.1.2.

Figura 7

30 Sensograma Biacore™ que muestra la señal de unión (línea gruesa) del anticuerpo secundario 8.1.2. al péptido pIGF-1R después de que este fuera capturado por el anticuerpo 1.4.168 en el chip Biacore™. Las otras señales (líneas finas) son señales de control: se dan las líneas de arriba a abajo 8.1.2 500 nM, 1.4.168 500 nM; anticuerpo no relacionado con la diana <CKMM>M-33-IgG 500 nM; y anticuerpo de control no relacionado con la diana <TSH>M-1.20-IgG 500 nM, respectivamente. No pudo detectarse ningún evento de unión en ninguno de estos controles.

Figura 8

40 Dibujo esquemático del ensayo Biacore™, que presenta los fijadores duales biotinilados en la superficie del sensor. En la celda de flujo 1 (= FC1) (no se muestra) se capturó amino-PEO-biotina. En la FC2, FC3 y FC4, se inmovilizaron agentes de unión bivalentes con longitud de conector creciente (se muestran los fijadores duales en FC2 (T0-bi = solo una T-Bi central) y FC4 (T40-bi = una T-Bi central y 20 Ts cada una en dirección 5' y en dirección 3', respectivamente). Analito 1: péptido IGF-1R que contiene el epítipo para ssFab' de M-1.4.168 en el extremo derecho del péptido (línea superior) - el fosfo-epítipo para ssFab' de M-8.1.2 no está presente, porque este péptido no se fosforila; analito 2: péptido pIGF-1R que contiene el fosfo-epítipo (P) para ssFab' de M-8.1.2 y el epítipo para ssFab' de M-1.4.168 (segunda línea); analito 3: péptido pIR, que contiene el fosfo-epítipo para ssFab' de M-8.1.2 con reactividad cruzada, pero no el epítipo para M-1.4.168 (tercera línea).

Figura 9

50 Datos cinéticos del experimento con el fijador dual. El fijador dual con conector T40-T-Bi con ssFab' 8.1.2 y ssFab' 1.4.168 (= T40 en la figura) muestra una velocidad de disociación 1300 veces menor ($k_d = 2,79 \text{ E-}05/\text{s}$) frente a pIGF-1R cuando se compara con pIR ($k_d = 3,70 \text{ E-}02/\text{s}$).

Figura 10

55 Sensograma Biacore™, que muestra la medición dependiente de la concentración del agente de unión dual T40-T-Bi frente al péptido pIGF-1R (el péptido IGF-1R fosforilado). La configuración del ensayo fue como se muestra en la figura 8. Se inyectó una serie de concentraciones del péptido pIGF-1R a 30 nM, 10 nM, $2 \times 3,3 \text{ nM}$, 1,1 nM, 0,4 nM, 0 nM. Los datos correspondientes se dan en la tabla de la figura 9.

Figura 11

65 Sensograma Biacore™, que muestra la medición dependiente de la concentración del agente de unión dual T40-T-Bi frente al péptido IGF-1R (el péptido IGF-1R no fosforilado). La configuración del ensayo fue como se muestra en la figura 8. Se inyectó una serie de concentraciones del péptido IGF-1R a 300 nM, 100 nM, $2 \times 33 \text{ nM}$, 11 nM, 4 nM, 0 nM. Los datos correspondientes se dan en la tabla de la figura 9.

Figura 12

Sensograma Biacore™, que muestra la medición dependiente de la concentración del agente de unión dual T40-T-Bi frente al péptido pIR (el péptido receptor de insulina fosforilado). La configuración del ensayo fue como se muestra en la figura 8. Se inyectó una serie de concentraciones del péptido pIR a 100 nM, 2 × 33 nM, 11 nM, 4 nM, 0 nM. Los datos correspondientes se dan en la tabla representada en la figura 9.

Figura 13

Agente de unión dual que se une al receptor de IGF1. Dos fragmentos Fab' de mAb1.4.168 se conjugan con ADN monocatenario e hibridan con un ADN adaptador y un ADN conector. Como se representa, el ADN conector lleva un marcador de biotina, que puede detectarse en tinciones inmunohistoquímicas.

Figura 14

Detección IHQ del receptor de IGF1 por el agente de unión dual. El agente de unión dual (1 µg/ml) tiñe células NIH3T3 transfectadas de forma estable que expresan el receptor de IGF1 (A). Un control negativo (monovalente) (Fab'-ADN monocatenario) sin el ADN adaptador se lava y no tiñe las células (B).

Figura 15

El fijador dual para la detección del heterodímero HER2/HER3. El fijador dual consta de dos fragmentos Fab, uno que reconoce HER2 (= <Her2> en la figura) y uno que reconoce HER3 (= <Her3> en la figura). Los fragmentos Fab se unen por un conector peptídico que consta de una etiqueta de hemaglutinina (HA) y unidades de motivos de residuos de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G4S). La longitud del conector puede variarse fácilmente mediante la introducción de varias unidades G4S (x = 1, 2, 3, 4 ...) para optimizar la distancia entre los fragmentos Fab para la detección del dímero. El fijador dual utilizado en el ejemplo 4 tiene dos unidades G4S (x = 1).

Ejemplo 1**Agente de unión bivalente a la troponina T****1.1 Anticuerpos monoclonales y fragmentos Fab'**

Se usaron dos anticuerpos monoclonales que se unen a troponina T cardíaca humana en diferentes epítomos no solapantes, epítomo A' y epítomo B', respectivamente. Estos dos anticuerpos se utilizan en el ensayo actual Elecsys™ para la troponina T de Roche, en el que se detecta la troponina T en un formato de inmunoensayo tipo sándwich.

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

Los anticuerpos monoclonales purificados se digieren con proteasas, bien con papaína preactivada (MAb anti-epítomo A') o pepsina (MAb anti-epítomo B'), produciendo fragmentos F(ab')₂ que posteriormente se reducen a fragmentos Fab', es decir A y B, respectivamente, en la fórmula I (A-a':a-S-b:b'-B), con una baja concentración de cisteamina a 37 °C. La reacción se detiene separando la cisteamina en una columna Sephadex G-25 (GE Healthcare) de la parte de la muestra que contiene el polipéptido.

1.2 Conjugación de fragmentos Fab' con oligonucleótidos de ADN monocatenario

Los fragmentos Fab' se conjugan con los oligonucleótidos activados de ADNa monocatenario y ADNb monocatenario, respectivamente, descritos a continuación.

Preparación de los conjugados de fragmento Fab' y ADN monocatenario A" y B", respectivamente:**a) Conjugado de Fab' de anti-troponina T <epítomo A'> y ADN monocatenario (= A")**

Para la preparación del conjugado A» de Fab' de anti-troponina T <epítomo A'> y ADNa monocatenario se usa un derivado de SEQ ID NO: 5, es decir 5'-AGT CTA TTA ATG CTT CTG C(=SEQ ID NO: 5)-XXX-Y-Z-3', en el que X = propileno-fosfato introducido a través de fosforamidita C3 (3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research), en el que Y = Modificador 3"-Amino C6 introducido a través del modificador 3'-amino TFA Amino C-6 Icaa CPG (ChemGenes) y en el que Z = 4[N-maleinimidometil]ciclohexano-1-carboxi introducido a través de sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (ThermoFischer)

b) Conjugado de Fab' de anti-troponina T <epítomo B'> y ADNb monocatenario (= B")

Para la preparación del conjugado de Fab' de anti-troponina T <epitopo B'> y ADN monocatenario (B'') se usa un derivado de SEQ ID NO: 6, es decir, 5'-Y-Z-XXX-AGT TCT ATC GTC GTC CA-3', en el que X = propileno-fosfato introducido a través de fosforamidita C3 (3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propil-1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research), en el que Y = Modificador 5'-Amino C6 introducido a través de (6-(4-monometoxitritilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (Glen Research), y en el que Z = 4[N-maleinimidometil]ciclohexano-1-carboxilo introducido a través de sulfosuccinimidil 4-[N-maleinimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (ThermoFischer).

Los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 5 o 6, respectivamente, se han sintetizado mediante los procedimientos de síntesis de oligonucleótidos del estado de la técnica. La introducción del grupo maleinimido se realizó por reacción del grupo amino de Y con el grupo succinimidilo de Z que se incorporó durante el proceso de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.

Las construcciones de ADN monocatenario mostradas anteriormente llevan un grupo maleimido reactivo con tiol que reacciona con una cisteína de la región bisagra de Fab' generada por el tratamiento con cisteamina. Para obtener un alto porcentaje de fragmentos Fab' con marcado único, la relación molar relativa de ADN monocatenario respecto a fragmento Fab' se mantiene baja. La purificación de fragmentos Fab' con marcado único (ADN monocatenario:Fab' = 1:1) se produce mediante cromatografía de intercambio aniónico (columna: MonoQ, GE Healthcare). La verificación del marcado y purificación eficientes se logra mediante cromatografía analítica de filtración en gel y SDS-PAGE.

1.3 Moléculas conectoras biotiniladas

Los oligonucleótidos utilizados en los conectores de ADN monocatenario L1, L2 y L3, respectivamente, se han sintetizado mediante los procedimientos de síntesis de oligonucleótidos del estado de la técnica y empleando un reactivo de fosforamidita biotinilada para la biotinilación.

El conector 1 (= L1), un conector de ADN monocatenario biotinilado 1 sin espaciador tiene la siguiente composición:

5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T (Biotina-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'. Comprende los oligonucleótidos de ADN monocatenario de SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente, y se biotiniló usando Biotina-dT (= T-Bi) (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-*t*-butilbenzoil)-biotinil)-aminohehexil]-3-acrimido]-2'-desoxiuridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research) en el medio del espaciador.

El conector 2 (= L2), un conector de ADN monocatenario 2 biotinilado con un espaciador basado en timidina de 11 mer tiene la siguiente composición:

5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T5-(Biotina-dT)-T5 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'. Comprende los oligonucleótidos de ADN monocatenario de SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente, dos tramos de oligonucleótidos de cinco timidinas cada uno y se biotiniló usando Biotina-dT (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-*t*-butilbenzoil)-biotinil)-aminohehexil]-3-acrimido]-2'-desoxiuridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research) en el medio del espaciador.

El conector 3 (= L3), un conector de ADN monocatenario 3 biotinilado con un espaciador basado en timidina de 31 mer tiene la siguiente composición:

5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T15-(Biotina-dT)-T15 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'. Comprende los oligonucleótidos de ADN monocatenario de SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente, dos tramos de oligonucleótidos de quince timidinas cada uno y se biotiniló usando Biotina-dT (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-*t*-butilbenzoil)-biotinil)-aminohehexil]-3-acrimido]-2'-desoxiuridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research).

1.4 Epítomos para los fijadores monovalentes de Troponina T A y B, respectivamente

Los péptidos sintéticos se han construido de forma que individualmente solo tienen una afinidad moderada por el fragmento Fab' correspondiente derivado de los anticuerpos anti-Troponina T a y b, respectivamente.

a) El epítomo A' para el anticuerpo a está comprendido en:

SEQ ID NO: 9 = SEQ ID NO:9 = ERAEQQRIRAEREKEUUSLKDRIEKRRRAERAE amida, en la que U representa β -alanina.

b) El epítomo B' para el anticuerpo b está comprendido en:

SEQ ID NO: 10 = SLKDRIERRRAERAEEOERAEQQRIRAEREKE amida, en la que O representa ácido amino-trioxa-octanoico.

Como apreciará el experto en la técnica, es posible combinar estos dos péptidos que contienen epítomos de dos maneras y ambas variantes se han diseñado y preparado combinando linealmente los epítomos A' y B'. Las secuencias

de ambas variantes, las secuencias lineales de los epítomos A'-B' (= TnT-1) y B'-A' (= TnT-2), respectivamente, se han preparado mediante los procedimientos de síntesis de péptidos del estado de la técnica.

5 Las secuencias para los epítomos A' y B', respectivamente, se habían modificado en comparación con los epítomos originales en la secuencia de troponina T cardíaca humana (P45379/UniProtKB) para reducir la afinidad de unión por cada uno de los Fab de la misma. En estas circunstancias, la dinámica del efecto de la unión heterobivalente es mejor visible, por ejemplo, analizando la afinidad de unión con la tecnología Biacore™.

10 **1.5 Análisis de interacción biomolecular**

Para este experimento, se utilizó un instrumento Biacore™ 3000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ SA montado en el sistema a T = 25 °C. El preacondicionamiento se realizó a 100 µl/min con una inyección de 3 × 1 min de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y 1 minuto de HCl 10 mM.

15 Como tampón del sistema se usó HBS-ET (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,05 %. El tampón de carga fue el tampón del sistema.

20 El sistema Biacore™ 3000 funcionó con el programa informático de control V1.1.1. La celda de flujo 1 se saturó con 7 RU de D-biotina. En la celda de flujo 2, se inmovilizaron 1063 RU del conector L1 de ADN monocatenario biotinilado. En la celda de flujo 3, se inmovilizaron 879 RU del conector L2 de ADN monocatenario biotinilado. En la celda de flujo 4, se capturaron 674 RU del conector L3 de ADN monocatenario biotinilado.

25 A continuación, se inyectó el conjugado A" de fragmento Fab' y ADN a 600 nM. Se inyectó el conjugado B" de fragmento Fab' y ADN en el sistema a 900 nM. Los conjugados se inyectaron durante 3 min a un caudal de 2 µl/min. Los conjugados se inyectaron consecutivamente para controlar la señal de saturación respectiva de cada conjugado de fragmento Fab' y ADN en su conector respectivo. Las combinaciones de Fab 'se realizaron con un solo conjugado A" de fragmento Fab' y ADN, un solo conjugado B" de fragmento Fab' y ADN y ambos conjugados A" y B" de fragmento Fab' y ADN presentes en el conector respectivo. Se generaron valores basales estables después de que los conectores se saturaran con los conjugados de fragmento Fab' y ADN, que era un requisito para mediciones cinéticas adicionales.

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

35 Se inyectó TnT-1 a 500 nM, se inyectó TnT-2 a una concentración de analito de 900 nM. Ambos péptidos se inyectaron a 50 µl/min durante un tiempo de asociación de 4 min. La disociación se controló durante 5 min. La regeneración se realizó mediante una inyección de 1 minuto a 50 µl/min de NaOH 50 mM en todas las celdas de flujo.

40 Los datos cinéticos se determinaron utilizando el programa informático Biaevaluation (V.4.1). La velocidad de disociación kd (1/s) de los péptidos TnT-1 y TnT-2 de las respectivas combinaciones de fragmentos Fab' presentados en la superficie se determinó de acuerdo con un modelo lineal de ajuste 1:1 de Langmuir. El semitiempo del complejo en minutos se calculó de acuerdo con la solución de la ecuación cinética de primer orden: ln(2)/(60 * kd).

Resultados:

45 Los datos experimentales dados en las tablas 1 y 2, respectivamente, demuestran un aumento de la estabilidad del complejo entre el analito (TnT-1 o TnT-2), respectivamente, y los diversos dímeros de Fab'-Fab' heterobivalentes A"-B" en comparación con el conjugado A" o B" monovalente de Fab' y ADN bicatenario, respectivamente. Este efecto se ve en cada tabla en la línea 1 en comparación con las líneas 2 y 3.

50 **Tabla 1: Datos del análisis usando TnT-1 con conectores de diversa longitud**

a) Conector L1			
Conjugado A" de fragmento Fab' y ADN	Conjugado B" de fragmento Fab' y ADN	kd (1/s)	t1/2 diss (min)
x	x	6,6E-03	1,7
x	-	3,2E-02	0,4
-	x	1,2E-01	0,1
b) Conector L2			
Conjugado A" de fragmento Fab' y ADN	Conjugado B" de fragmento Fab' y ADN	kd (1/s)	t1/2 diss (min)

x	x	4,85E-03	2,4
x	-	2,8E-02	0,4
-	x	1,3E-01	0,1
c) conector L3			
Conjugado A" de fragmento Fab' y ADN	Conjugado B" de fragmento Fab' y ADN	kd (/1/s)	t1/2 diss (min)
x	x	2,0E-03	5,7
x	-	1,57E-02	0,7
-	x	1,56E-02	0,7

Tabla 2: Datos del análisis usando TnT-2 con conectores de diversa longitud

a) Conector L1			
Conjugado A" de fragmento Fab' y ADN	Conjugado B" de fragmento Fab' y ADN	kd (/1/s)	t1/2 diss (min)
x	x	1,4E-02	0,8
x	-	4,3E-02	0,3
-	x	1,4E-01	0,1
b) Conector L2			
Conjugado A" de fragmento Fab' y ADN	Conjugado B" de fragmento Fab' y ADN	kd (/1/s)	t1/2 diss (min)
x	x	4,9E-03	2,3
x	-	3,5E-02	0,3
-	x	1,3E-01	0,1
c) Conector L3			
Conjugado A" de fragmento Fab' y ADN	Conjugado B" de fragmento Fab' y ADN	kd (/1/s)	t1/2 diss (min)
x	x	8,0E-03	1,5
x	-	4,9E-02	0,2
-	x	3,2E-01	0,04

El efecto de avidez depende además de la longitud del conector. En las subtablas mostradas en la tabla 1, es decir, para el analito artificial TnT-1, el conector L3 que comprende un espaciador de 31 mer muestra la tasa de disociación más baja o la estabilidad más alta del complejo.

10 En las subtablas mostradas en la tabla 2, el conector L2 que comprende un espaciador de 11 mer muestra la tasa de disociación más baja o la mayor estabilidad de complejo para el analito artificial TnT-2.

15 Estos datos tomados conjuntamente demuestran que la flexibilidad en la longitud del conector como inherente al método dado en la presente invención es de gran utilidad y ventaja.

Ejemplo 2

Agente de unión bivalente a IGF-1R fosforilado

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

a) Inmunización de ratones

25 Se inmunizó a ratones BALB/C en las semanas 0, 3, 6 y 9, respectivamente. Según la inmunización, se usan 100 µg del conjugado que comprende el péptido fosforilado pIGF-1R (1340-1366) (SEQ ID NO: 11). Este péptido se había

fosforilado en tirosina 1346 (= 1346-pTyr) y acoplado a KLH a través de la cisteína C-terminal (= Aoc-Cys-MP-KLH-1340) para producir el conjugado utilizado para la inmunización. En las semanas 0 y 6, respectivamente, la inmunización se lleva a cabo por vía intraperitoneal y en las semanas 3 y 9, respectivamente, por vía subcutánea en diversas partes del cuerpo del ratón.

5

b) Fusión y clonación

Las células del bazo de los ratones inmunizados se fusionan con células de mieloma de acuerdo con Galfre G., and Milstein C., *Methods in Enzymology* 73 (1981) 3-46. En este procedimiento cerca de 1×10^8 células de bazo de un ratón inmunizado se mezclan con 2×10^7 células de mieloma a(P3X63-Ag8653, ATCC CRL1580) y se centrifugan (10 min a 250 g y 37 °C). Las células se lavan a continuación una vez con medio RPMI 1640 sin suero bovino fetal (FCS) y se centrifugan nuevamente a 250 g en un tubo cónico de 50 ml. El sobrenadante se descarta, el sedimento celular se suelta suavemente mediante golpeteo, se añade 1 ml de PEG (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) y se mezcla mediante pipeteo. Después de 1 min de incubación en un baño de agua a 37 °C, se añaden gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin FCS a temperatura ambiente en un período de 4-5 minutos. Esta etapa se repite con 10 ml adicionales de RPMI 1640 sin FCS. Después, se añaden 25 ml de RPMI 1640 que contiene FCS al 10 %, seguido por una etapa de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Después de la centrifugación durante 10 min a 250 g y 4 °C, las células sedimentadas se recogen en medio RPMI 1640 que contiene FCS al 10 % y se siembran en medio de selección hipoxantina-azaserina (100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina en RPMI 1640 + FCS al 10 %). Se añade interleucina 6 a 100 U/ml al medio como factor de crecimiento. Después de 7 días, el medio se intercambia con medio nuevo. El día 10, los cultivos primarios se someten a prueba para detectar anticuerpos específicos. Los cultivos primarios positivos se clonan en placas de cultivo celular de 96 pocillos por medio de un separador celular activado por fluorescencia.

c) Aislamiento de inmunoglobulinas desde los sobrenadantes del cultivo celular

Las células de hibridoma obtenidas se siembran a una densidad de 1×10^7 células en matraces CELLline 1000 CL (Integra). Los sobrenadantes de células de hibridoma que contienen IgG se recogen dos veces a la semana. Los rendimientos típicamente varían entre 400 µg y 2000 µg de anticuerpo monoclonal por 1 ml de sobrenadante. La purificación del anticuerpo desde el sobrenadante del cultivo se llevó a cabo utilizando procedimientos convencionales de química de proteínas (por ejemplo, de acuerdo con Bruck, C., *Methods in Enzymology* 121 (1986) 587-695).

30

2.2 Síntesis de oligonucleótidos hibridables

Los siguientes precursores modificados con amino, que comprenden las secuencias dadas en SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente, se sintetizaron de acuerdo con procedimientos estándar. Los oligonucleótidos dados a continuación comprenden no solo el llamado aminoconector, sino también un colorante fluorescente. Como el experto en la técnica apreciará fácilmente, este colorante fluorescente es muy conveniente para facilitar la purificación del oligonucleótido como tal, así como de los componentes que los comprenden.

40

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

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

45

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

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

50

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

La síntesis se realizó en un sintetizador ABI 394 a una escala de 10 µmol en modo con tritilo (para modificación amino 5') o sin tritilo (para modificación 3' amino) usando CPG disponibles comercialmente como soportes sólidos y fosforamiditas dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) estándar (Sigma Aldrich).

55

Las siguientes amiditas, modificadores amino y soportes de CPG se usaron para introducir el espaciador C3, un colorante y restos amino, respectivamente, durante la síntesis de oligonucleótidos:

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

El modificador 5' amino se introduce usando modificador 5'-amino C6 (6-(4-monometoxitritilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (Glen Research);

65

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

fosforamidita (Glen Research);

Fosforamidita Cy5™ cloruro de 1-[3-(4-monometoxitritilo)propil]-1'-[3-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil fosforamiditil)propil]-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Glen Research);

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

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

Para oligonucleótidos marcados con Cy5, se usaron fosforamiditas dA(tac), dT, dG(tac) dC(tac) (Sigma Aldrich) y se realizó la desprotección con amoníaco al 33 % durante 2 h a temperatura ambiente.

Los oligonucleótidos de L-ADN se sintetizaron utilizando fosforamiditas beta-L-dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) (Chemgenes)

La purificación de oligonucleótidos hibridables modificados con fluoresceína se realizó mediante un procedimiento de dos etapas: Primero, los oligonucleótidos se purificaron en HPLC de fase inversa (Merck-Hitachi-HPLC, columna RP-18, sistema de gradiente [A: (Et3NH)OAc 0,1 M (pH 7.0)/MeCN 95:5; B: MeCN]: 3 min, 20 % de B en A, 12 min, 20-50 % de B en A y 25 min, 20 % de B en A con un caudal de 1,0 ml/min, detección a 260 nm. Las fracciones (monitorizadas por RP HPLC analítica) que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporaron a sequedad. (Los oligonucleótidos modificados en el extremo 5' con el grupo alquilamino protegido con monometoxitritilo se destrilan incubando con ácido acético al 20 % durante 20 min). Los oligómeros que contienen fluoresceína como marcador se purificaron de nuevo mediante cromatografía IEX en una columna de HPLC [columna Mono Q: Tampón A: Hidróxido de sodio (10 mM/l; pH ~12) Tampón B Cloruro de sodio 1 M disuelto en hidróxido de sodio (10 mM/l; pH ~12) gradiente: en 30 minutos desde 100 % de tampón A hasta 100 % de tampón B caudal 1 ml/min detección a 260 nm]. El producto fue desalado por diálisis.

Se usaron oligómeros marcados con Cy5 después de la primera purificación en HPLC de fase inversa (Merck-Hitachi-HPLC, columna RP-18, sistema de gradiente [A: (Et3NH)OAc 0,1 M (pH 7.0)/MeCN 95:5; B: MeCN]: 3 min, 20 % de B en A, 12 min, 20-50 % de B en A y 25 min, 20 % de B en A con un caudal de 1,0 ml/min, detección a 260 nm. Los oligómeros se desalaron por diálisis y se liofilizaron en un evaporador Speed-Vac para producir sólidos que se congelaron a -24 °C.

2.3 Activación de oligonucleótidos hibridables

Los oligonucleótidos modificados con amino del ejemplo 2 se disolvieron en tampón de borato de sodio 0,1 M pH 8,5 (c = 600 µmol) y se hicieron reaccionar con un exceso molar de 18 veces de Sulfo SMCC (sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato disuelto en DMF (c = 3 mg/100 µl) de Thermo Scientific. El producto de reacción se dializó completamente frente a agua para extraer el producto de hidrólisis de sulfoSMCC 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato.

El dializado se concentró por evaporación y se usó directamente para la conjugación con un fijador monovalente que comprendía un grupo tiol.

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

Los oligonucleótidos se sintetizaron mediante procedimientos estándar en un sintetizador ABI 394 a una escala de 10 µmol en el modo con tritilo usando dT-CPG comercialmente disponible como soportes sólidos y utilizando fosforamiditas dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) estándar (Sigma Aldrich).

Los oligonucleótidos de L-ADN se sintetizaron utilizando beta L-dT-CPG disponible comercialmente como soporte sólido y fosforamiditas beta-L-dA(bz), dT, dG (iBu) y dC(Bz) (Chemgenes)

La purificación de los oligonucleótidos se realizó como se describe en el ejemplo 2.3 en una HPLC de fase inversa. Las fracciones (analizadas/monitorizadas por RP HPLC analítica) que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporaron a sequedad. La destrilación se realizó incubando con ácido acético al 80 % durante 15 minutos). El ácido acético se extrajo por evaporación. El resto se disolvió en agua y se liofilizó

Se usaron las siguientes amiditas y soportes CPG para introducir el espaciador C18, digoxigenina y grupo biotina durante la síntesis de oligonucleótidos:

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

Biotina-dT (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-t-butilbenzoil)-biotinil)-aminohexil]-3-acrilimido]-2'-desoxiuridina-3'-[(2-

cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research);

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

5'-Dimetoxitritil-5-[N-(trifluoroacetilamino)hexil]-3-acrilimido]-2'-desoxiuridina,3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita para modificación con amino y marcado posterior con éster digoxigenin-N-hidroxil-succinimidílico

Se sintetizaron las siguientes construcciones intermedias o conectores:

Conector 1: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 2: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(T40)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 3: 5'-[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Biotina-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 4: 5'-[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T5-(Biotina-dT)-T5-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 5: 5'-[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T20-(Biotina-dT)-T20-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 6: 5'-[B-L] G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T30-(Biotina-dT)-T30-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 7: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T5-(Biotina-dT)-T5 TG GAC GAC GAT AGA ACT-3'

Conector 8: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T10-(Biotina-dT)-T10 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 9: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T15-(Biotina-dT)-T15 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 10: 5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T20-(Biotina-dT)-T20 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 11: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-Espaciador C18- (Biotina-dT)-Espaciador C18-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 12: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Espaciador C18)2-(Biotina-dT)-(Espaciador C18)2-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 13: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Espaciador C18)3-(Biotina-dT)-(Espaciador C18)3-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 14: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Espaciador C18)4-(Biotina-dT)-(Espaciador C18)4-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 15: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T20-(Dig-dT)-T20-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 16: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Dig-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Conector 17: 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Biotin-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

Los ejemplos de construcciones intermedias anteriores comprenden al menos un primer oligonucleótido hibridable y un segundo oligonucleótido hibridable. Los conectores 3 a 17 además de los tramos de ácido nucleico hibridable comprenden una timidina central biotinilada o digoxigenilada, respectivamente, o un espaciador que consiste en unidades de timidina de la longitud dada anteriormente.

El oligonucleótido hibridable en 5' corresponde a la SEQ ID NO: 7 y el oligonucleótido hibridable en 3' corresponde a la SEQ ID NO: 8, respectivamente. El oligonucleótido de SEQ ID NO: 7 se hibridará fácilmente con el oligonucleótido de SED ID NO: 5. El oligonucleótido de SEQ ID NO: 8 se hibridará fácilmente con el oligonucleótido de SED ID NO: 6.

En la construcción intermedia anterior, los ejemplos [B-L] indican que se da una secuencia oligonucleotídica de L-ADN; el espaciador C18, biotina y biotina dT, respectivamente, se refieren al espaciador C18, la biotina y la biotina-dT como se derivan de los bloques de construcción dados anteriormente; y T con un número indica el número de residuos de timidina incorporados en el conector en la posición dada.

2.5 Ensamblaje de construcción de fijador dual

A) Escisión de IgG y marcado de fragmentos Fab' con ADN monocatenario

Los anticuerpos monoclonales purificados se escindieron con la ayuda de la proteasa pepsina produciendo fragmentos F(ab')₂ que posteriormente se redujeron a fragmentos Fab' por tratamiento con bajas concentraciones de cisteamina a 37 °C. La reacción se detiene por separación de cisteamina en una columna PD 10. Los fragmentos Fab' se marcan con un oligonucleótido activado como se produce de acuerdo con el ejemplo 3. Este ADN monocatenario (= ADNss) porta un grupo maleimido reactivo con tiol que reacciona con las cisteínas de la región bisagra de Fab'. Para obtener altos porcentajes de fragmentos Fab' con marcado único, la relación molar relativa de ADN monocatenario fragmento Fab' se mantiene baja. La purificación de fragmentos Fab' con marcado único (ADN monocatenario: Fab' = 1:1) se produce mediante cromatografía de intercambio iónico (columna: Source 15 Q PE 4.6/100, Pharmacia/GE). La verificación de la purificación eficiente se logra mediante filtración en gel analítica y SDS-PAGE.

B) Ensamblaje de un fijador dual anti-pIGF-1R.

El fijador dual anti-pIGF-1R se basa en dos fragmentos Fab' que se dirigen a diferentes epítomos del dominio intracelular de IGF-1R: el Fab' de 8.1.2 detecta un sitio de fosforilación (pTyr 1346) y el Fab' de 1.4.168 un sitio no fosforilado de dicha proteína diana. Los fragmentos Fab' se han unido covalentemente al ADN monocatenario (ADNss): el Fab' de 1.4.168 a un ADN monocatenario de 17 mer que comprende la SEQ ID NO: 6 y que contiene fluoresceína como marcador fluorescente y el Fab' de 8.1.2 a un ADN monocatenario de 19 mer que comprende la SEQ ID NO: 5 y que contiene Cy5 como marcador fluorescente. A continuación, estos Fab con ADN monocatenario de 17 mer o 19 mer unidos de forma covalente se denominan ssFab' de 1.4.168 y ssFab' de 8.1.2, respectivamente. El ensamblaje del fijador dual está mediado por un conector (es decir, una construcción puente que comprende dos oligonucleótidos de ADN monocatenario complementario (SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente) que hibridan con los ADN monocatenarios correspondientes de los fragmentos ssFab'. La distancia entre los dos fragmentos ssFab' del fijador dual puede modificarse utilizando espaciadores, por ejemplo, espaciador C18 o ADN de diferente longitud, respectivamente.

Para la evaluación del ensamblaje, los componentes del fijador dual ssFab' de 8.1.2, ssFab' de 1.4.168 y las construcciones conectoras (I) (= conector 17 del ejemplo 2.4) 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT T(-Bi)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' y (II) (= conector 10 del ejemplo 2.4) 5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(T20)-T(-Bi)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' se mezclaron en cantidades equimolares a temperatura ambiente. Después de una etapa de incubación de 1 minuto, la mezcla de reacción se analizó en una columna analítica de filtración en gel (Superdex™ 200, 10/300 GL, GE Healthcare). La comparación de los volúmenes de elución (V_E) de los componentes del fijador dual único con el V_E de la mezcla de reacción demuestra que el fijador dual se ha formado con éxito (figura 1). (La timidina biotinilada (T-(Bi)) en el medio de ambos conectores no tiene función en estos experimentos.)

2.6 Experimento de Biacore™ que evalúa la unión de un fijador dual anti-pIGF-1R a los péptidos IGF-1R e IR inmovilizados

Para este experimento, se utilizó un instrumento Biacore™ 2000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ SA montado en el sistema a T = 25 °C. El preacondicionamiento ocurrió a 100 µl/min con una inyección de 3 × 1 min de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y 1 minuto de HCl 10 mM.

Como tampón del sistema se usó HBS-ET (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® 20 al 0,05 %. El tampón de carga fue idéntico al tampón del sistema. El sistema Biacore™ 2000 funcionó con el programa informático de control V1.1.1.

Posteriormente, se capturaron péptidos biotinilados en la superficie de SA en las respectivas celdas de flujo. En la celda de flujo 2 se capturaron 16 RU de IGF-1R(1340-1366)[1346-pTyr; Glu(Bi-PEG-1340)amida (es decir, el péptido fosforilado con tirosina 1346 de SEQ ID NO: 11 que comprendía un conector de PEG unido a través de ácido glutámico correspondiente a la posición 1340 y que está biotinilado en el otro extremo del conector). En la celda de flujo 3 se capturaron 18 RU de IGF-1R(1340-1366); Glu(Bi-PEG-1340)amida (es decir, el péptido no fosforilado con tirosina 1346 de SEQ ID NO: 11 que comprendía un conector de PEG unido a través de ácido glutámico correspondiente a la posición 1340 y que está biotinilado en el otro extremo del conector). En la celda de flujo 4 se capturaron 20 RU de h1R(1355-1382)[1361-pTyr; Glu(Bi-PEG-1355)amida (es decir, el péptido fosforilado con tirosina 1361 de SEQ ID NO: 12 que comprendía un conector de PEG unido a través de ácido glutámico correspondiente a la posición 1355 del receptor de insulina humana y que está biotinilado en el otro extremo del conector). Finalmente, todas las celdas de flujo se saturaron con d-biotina.

Para la formación del fijador dual, se utilizó el protocolo de ensamblaje como se describe en el ejemplo 2.5. Cuando se realizaron experimentos individuales con solo uno de los dos ssFab', la ausencia o presencia de ADN conector no afectó a las curvas de asociación o disociación (datos no mostrados).

Se inyectaron 100 nM de analito (es decir, en estos experimentos, un agente de unión dual bivalente) en solución a 50 µl/min durante un tiempo de asociación de 240 segundos y se controló la disociación durante 500 segundos. Se logró una regeneración eficiente usando una etapa de inyección de 1 minuto a 50 µl/min con NaOH 80 mM. La celda de flujo 1 sirvió como referencia. Se utilizó una inyección de tampón de blanco en lugar de una inyección de antígeno

para hacer doble referencia de los datos mediante la resta de la señal del tampón. En cada ciclo de medición, se inyectó uno de los siguientes analitos en solución sobre las 4 celdas de flujo: ssFab' de 8.1.2 100 nM, ssFab' de 1.4.168 100 nM, una mezcla de ssFab' de 8.1.2 100 nM y ssFab' 100 nM, agente de unión bivalente 100 nM que consistía en ssFab' de 8.1.2 y ssFab' de 1.4.168 hibridado en el conector (III) (5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(20)-T(-Dig)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' (= conector 15 del ejemplo 2.4)), y agente de unión bivalente 100 nM que consistían en ssFab' de 8.1.2 y ssFab' de 1.4.168 hibridado en el conector (IV) (5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(-Dig) -TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' (= conector 16 del ejemplo 2.4)), respectivamente. (La digoxigenilación de la timidina del medio (T(-Dig)) en los conectores anteriores carece de relevancia para estos experimentos.)

Las señales se controlaron como sensogramas Biacore™ cronodependientes.

Los puntos de informe se establecieron al final de la fase de asociación del analito (Unión tardía (*Binding Late*), BL) y al final de la fase de disociación del analito (Estabilidad tardía (*Stability Late*), SL) para controlar las alturas de la señal de la unidad de respuesta de cada interacción. Las velocidades de disociación kd (1/s) se calcularon de acuerdo con un ajuste lineal 1:1 de Langmuir usando el programa informático de evaluación Biacore™ 4.1. Los semitiempos del complejo en minutos se calcularon con la fórmula $\ln(2)/(60 * kd)$.

Los sensogramas (figura 2-5) muestran una ganancia tanto en especificidad como en estabilidad del complejo en la unión a pIGF-1R cuando se usan ssFab' de 1.4.168 y ssFab' de 1.4.168 en forma de un fijador dual (= agente de unión bivalente), probablemente debido al efecto de unión cooperativa subyacente. El Fab' de 1.4.168 solo no muestra reactividad cruzada para el péptido pIR, pero no discrimina entre la forma fosforilada y no fosforilada de IGF-1R (T1/2 dis = 3 min en ambos casos). El Fab' de 8.1.2, sin embargo, se une solo a la versión fosforilada del péptido IGF1-R pero muestra alguna reactividad cruzada no deseada con el receptor de insulina fosforilado. El fijador dual discrimina bien entre el péptido pIGF-1R y los otros dos péptidos (véase la figura 4) y, por lo tanto, ayuda a resolver problemas de unión inespecífica. Obsérvese que la ganancia en especificidad se pierde cuando ambos Fab' se aplican sin el ADN conector (figura 5). La ganancia en afinidad del fijador dual hacia el péptido pIGF-1R se manifiesta en semitiempos de disociación aumentados en comparación con los Fab' individuales y la mezcla de Fab' que omite el ADN conector (figura 3 y figura 5). Aunque los fijadores duales sometidos a prueba con dos longitudes de conector de ADN diferentes comparten un efecto positivo general sobre la especificidad y afinidad de unión a la diana, el conector más largo ((III) con T40-T-Dig como espaciador) (es decir, el conector 15 del ejemplo 2.4) parece ser ventajoso con respecto a ambos criterios.

2.7 Sándwich de ensayo Biacore™ de M-1.4.168-IgG y M-8.1.2-IgG

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

El tampón del sistema era HBS-ET (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® al 0,05 %). El buffer de carga fue el búfer del sistema.

El sistema Biacore™ T100 funcionó con el programa informático de control V1.1.1. Se inmovilizó anticuerpo policlonal de IgG de conejo <lgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) a 30 µg/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) a 10 000 RU en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4, respectivamente, a través de química EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, la superficie del sensor se bloqueó con una solución de etanolamina 1 M. El experimento completo se realizó a 13 °C.

Se capturó mAb primario M-1.004.168-IgG 500 nM durante 1 min a 10 µl/min en la superficie de <lgGFCyM>R Se inyectaron 3 µM de una mezcla de fragmentos de IgG (de las clases de IgG IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) que contenía la solución de bloqueo a 30 µl/min durante 5 min. El péptido IGF-IR(1340-1366)[1346-pTyr; Glu(Bi-PEG-1340)amida se inyectó a 300 nM durante 3 minutos a 30 µl/min. Se inyectó anticuerpo secundario M-8.1.2-IgG 300 nM a 30 µl min. El sensor se regeneró usando glicina-HCl 10 mM pH 1,7 a 50 µl/min durante 3 minutos.

La figura 6 describe la configuración del ensayo. En la figura 7, se dan los resultados de la medición. Las mediciones indican claramente que ambos anticuerpos monoclonales son capaces de unir simultáneamente dos epítopos distintos no relacionados en su péptido diana respectivo. Este es un requisito para cualquier experimento posterior con el objetivo de generar eventos de unión cooperativa.

2.8 Fijador dual del ensayo Biacore™ en la superficie del sensor

Se utilizó un instrumento Biacore™ 3000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ SA montado en el sistema a T = 25 °C. El sistema se preacondicionó a 100 µl/min con una inyección de 3 × 1 min de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y 1 minuto de HCl 10 mM.

El tampón del sistema era HBS-ET (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® al 0,05 %). El buffer

de carga fue el búfer del sistema.

El sistema Biacore™ 3000 funcionó con el programa informático de control V4.1.

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

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

15 La disociación se controló a 50 µl/min durante 5,3 minutos. El sistema se regeneró después de cada etapa de concentración con un pulso de 12 segundos de NaOH 250 mM y se recargó con el ligando de ssFab'.

20 La figura 8 describe esquemáticamente la configuración del ensayo en el instrumento Biacore™. La tabla dada en la figura 9 muestra los resultados de cuantificación de este método. Las figuras 10, 11 y 12 representan ejemplos de resultados de Biacore™ de esta configuración de ensayo utilizando el agente de unión dual T40.

25 La tabla en la figura 9 demuestra los beneficios del concepto de fijador dual. El agente de unión dual T40 (un agente de unión dual con el conector 10 del ejemplo 2.4, es decir, un conector con un espaciador de T20-Biotina-dT-T20) da como resultado un semitiempo del complejo antigénico mejorado multiplicado por 2 (414 min) y una afinidad mejorada multiplicada por 3 (10 pM) en comparación con el agente de unión dual T0 (es decir, un agente de unión dual con el conector 16 del ejemplo 2.4) con 192 min y 30 pM, respectivamente. Esto subraya la necesidad de optimizar la longitud del conector para generar el efecto de unión cooperativa óptima.

30 El agente de unión dual T40 (es decir, el agente de unión dual que comprende el conector T40-T-Bi (conector 10 del ejemplo 2.4)) muestra una afinidad de 10 pM frente al péptido IGF-1R fosforilado (tabla en la figura 9, figura 10) . Esto es una mejora de la afinidad en 2400 veces frente al péptido de receptor de insulina fosforilado (24 nM) y una mejora en 100 veces frente al péptido IGF-1R no fosforilado. Por lo tanto, se logra el objetivo de aumentar la especificidad y la afinidad mediante la combinación de dos eventos de unión distintos y separados.

35 El efecto de unión cooperativa se vuelve especialmente obvio a partir de las velocidades de disociación frente al péptido IGF-1R fosforilado, en el que el fijador dual muestra un semitiempo del complejo antigénico de 414 min, frente a 0,5 min con el fijador monovalente 8.1.2 solo y frente a 3 min con el fijador monovalente 1.4.168 solo, respectivamente.

40 Además, la construcción completamente ensamblada multiplica aproximadamente sus velocidades de disociación kd (1/s), en comparación con las construcciones hibridadas con Fab' individuales (figuras 10, 11, 12 y tabla en la figura 9). Curiosamente, también la tasa de asociación ka (1/Ms) aumenta ligeramente en comparación con los eventos de interacción con Fab' individuales; esto puede deberse a un aumento de la flexibilidad molecular de la construcción.

45 Un sistema de diagnóstico que utilice un procedimiento de lavado intenso definitivamente debería fomentar sin duda el alto rendimiento del agente de unión dual T40, en contraste con las moléculas de Fab' individuales (monovalentes). La construcción hibridada, es decir, un agente de unión bivalente de acuerdo con la presente invención, genera un evento de unión específico y bastante estable, mientras que los fijadores monovalentes se disocian más rápidamente, por ejemplo, se eliminan más rápidamente por lavado.

55 **Ejemplo 3:**

Agente de unión bivalente: unión a la forma homodimérica del factor de crecimiento insulinoide 1

60 El receptor del factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF1-R) pertenece a la familia de los receptores tirosina-cinásicos y se activa por el IGF1. El receptor es homodimérico.

65 Un monómero de IGF1-R consiste en una subunidad α extracelular que se une de forma covalente a una subunidad β transmembranaria a través de un puente disulfuro. Dos monómeros se unen de forma covalente por un puente disulfuro entre las subunidades α de dos monómeros. El receptor de IGF1 desempeña un papel importante en el cáncer, el envejecimiento y la transducción de señales de insulina.

El fijador dimérico, hemos desarrollado, comprende dos fragmentos Fab' idénticos. Estos dos fragmentos Fab', cuando se usan individualmente, se unen a su péptido diana (IGF1-R) solo con baja estabilidad del complejo. Para producir un agente de unión bivalente, el fragmento Fab' se conjuga con un oligonucleótido hibridable. Un ADN adaptador capaz de hibridar tanto con el ADN conector como con este oligonucleótido se usa como un puente para hibridar con el ADN-Fab' y el ADN-conector, para proporcionar un agente de unión bivalente estable que también presenta la distancia apropiada para a los fijadores monovalentes empleados (un esquema se da en la figura 13). Este fijador dual anti-IGF1-R se sometió a prueba en un sistema de tinción inmunohistoquímica automatizado (Ventana BenchMark® XT).

3.1 Desarrollo de un anticuerpo monoclonal de baja afinidad contra el receptor IGF1

a) Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones Balb/c con un péptido de IGF1R(1340-1366)[1346-pTyr; Aoc-Dys-MP-KLH-1340] amida. (La secuencia aminoacídica no fosforilada se da como SEQ ID NO: 11). La dosis de inmunización inicial fue 100 µg. Los ratones se inmunizaron además con 100 µg de inmunógeno después de 4, 8 y 12 semanas.

b) Fusión y clonación

Las células del bazo de los ratones mencionados anteriormente se fusionan con células de mieloma de acuerdo con Galfre G., and Milstein C., Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46. En este procedimiento, 1×10^8 células de bazo del ratón inmunizado se mezclaron con 2×10^7 células de mieloma (P3x63-Ag8-653, ATCC CRL1580) y se centrifugaron durante 10 min a 250 g y 37 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se aflojó mediante golpeteo. Se añadió 1 ml de PEG (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) gota a gota en 1 minuto a 37 °C en un baño de agua. Posteriormente, se añadieron gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin FCS en 5 minutos, seguidos de 10 ml adicionales de RPMI 1640 sin FCS, que se añadieron gota a gota en 10 minutos. Como etapa siguiente, se añadieron 25 ml de RPMI 1640 con FCS al 10 %, 100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina y 50 u de IL-6 y las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 60 min y a continuación se centrifugaron a 250 g durante 10 min. El sedimento celular se resuspendió en 30 ml de RPMI 1640 con FCS al 10 %, 100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina y 50 u de IL-6, y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂.

c) Aislamiento de inmunoglobulinas desde los sobrenadantes del cultivo celular

Después de cerca de 10 días, los cultivos primarios se sometieron a prueba para determinar la especificidad por el antígeno. Los cultivos primarios positivos se clonaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos por medio de un separador celular activado por fluorescencia. Después del crecimiento posterior en una placa de 24 pocillos, una placa de 6 pocillos y un matraz T75 (Corning) en medio Hyclone (Thermo Scientific) con suplementos de Nutridoma (Roche), las células de hibridoma que expresaban el anticuerpo de baja afinidad deseado finalmente se cultivaron en un biorreactor CeLLine (Integra biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo más prometedor se llamó mAb 1.4.168.

d) Caracterización biofísica de mAb 1.4.168

Las propiedades cinéticas de la interacción entre el mAb 1.4.168 y el receptor de IGF1 se investigaron mediante resonancia de plasmones superficiales utilizando la tecnología Biacore™.

Se utilizó un instrumento Biacore™ T100 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ CM5 montado en el sistema a T = 25 °C y se preconditionó mediante una inyección de 1 minuto a 100 µl/min de SDS al 0,1 %, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H₃PO₄ 100 mM. El tampón del sistema era HBS-ET (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® al 0,05 %). El buffer de carga fue el búfer del sistema.

El sistema Biacore™ T100 funcionó con el programa informático de control V1.1.1. Se inmovilizó anticuerpo policlonal de IgG de conejo <IgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) a 30 µg/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) a 8000 RU en las celdas de flujo 1, 2, 3, 4 a través de química EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, la superficie del sensor se bloqueó con una solución de etanolamina 1 M.

Se capturaron mAb M-1.004.168-IgG 250 nM durante 1 min a 10 µl/min en la superficie de <IgGFCyM>R

Una serie de concentraciones de 900 nM, 300 nM, 150 nM, 50 nM, 17 nM, 6 nM y 0 nM del péptido IGF-1R(1340-1366) [1346-pTyr; Glu(Bi-PEG-1340)]amida se usó como analito en solución y se inyectó a 100 µl/min durante un tiempo de asociación de 3 min. La disociación se vigiló durante 10 min a 100 µl/min. Como control, una etapa de concentración se analizó dos veces para garantizar la reproducibilidad del ensayo. La celda de flujo 1 sirvió como celda de referencia. Se utilizó una inyección de tampón de blanco en lugar de una inyección de antígeno para hacer doble referencia de los datos mediante la resta de la señal del tampón. El sistema de captura se regeneró usando una inyección de 3 minutos a 10 µl/min con glicina 10 mM, pH 1,7.

Los datos se evaluaron de acuerdo con un modelo binario de interacción 1:1 de Langmuir para calcular la constante de velocidad de asociación k_a [1/MS], la constante de velocidad de disociación k_d [1/s] y la constante de afinidad resultante K_D [M] usando el programa informático de evaluación Biacore™ T100 V.1.1.1. La constante de velocidad de disociación para mAb 1.4.168 fue de $3,6 \times 10^{-3}$ 1/s y, en consecuencia, dentro del intervalo de anticuerpos con baja estabilidad del complejo, requerida para nuestro método de fijador dual.

Además, se usó resonancia de plasmones superficiales para determinar la especificidad del antígeno. Se utilizó un instrumento Biacore™ 2000 (GE Healthcare) con un sensor Biacore™ SA montado en el sistema a $T = 25^\circ\text{C}$ y se preconditionó a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ con una inyección de 3×1 min de NaCl 1 M en NaOH 50 mM y 1 minuto de HCl 10 mM. El tampón del sistema era HBS-ET (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween® al 0,05 %). El tampón de carga era el tampón del sistema + 1 mg/ml de CMD (carboximetildextrano, Sigma).

Posteriormente, se capturaron péptidos biotinilados en la superficie de SA en las respectivas celdas de flujo. Las celdas de flujo finalmente se saturaron con d-biotina 2 μM . El sobrenadante del cultivo de clones de hibridoma se diluyó 1:2 y se inyectó durante 2 minutos a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, la disociación se controló durante 5 minutos. Regeneración a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ con inyección de 1,5 minutos con Gly/HCl 10 mM, pH 1,7. La celda de flujo 1 sirvió como referencia. Se utilizó una inyección de tampón de blanco en lugar de una inyección de antígeno para hacer doble referencia de los datos mediante la resta de la señal del tampón. Los datos se evaluaron de acuerdo con el programa informático de evaluación Biacore™ 1.1.1. La altura de la señal se midió al final del tiempo de inyección, Unión tardía (RU). La tabla 3 a continuación muestra claramente que el mAb 1.4.168 reconoció el péptido IGF-1R fosforilado y no fosforilado (SEQ ID NO: 11) igualmente bien, pero no interactuó con el péptido de receptor de insulina fosforilado (SEQ ID NO: 12).

Tabla 3: Ensayo de especificidad

FC	Ligando	RU	Analito	Unión tardía (RU)
1	Bi	7	1.004.168	-
2	IGF-1R(1340-1366)PEG-Bi	87		199
3	IGF-1R(1340-1366)ph1346-PEG-Bi	97		265
4	Bi-InsulinaR (1356-1382) p1361	80		0

FC = celda de flujo, ligando = biotina y péptidos biotinilados, respectivamente, capturados en el chip recubierto de SA, RU = unidad de resonancia (se correlaciona con la masa de bipéptidos capturados como ligando en la superficie de SA), analito = mAb 1.4.168 en solución, unión tardía (RU) = altura de la señal al final de la fase de inyección del analito.

3.2 Purificación de anticuerpos, escisión de Ig y generación de fragmentos Fab'

a) Purificación

El mAb 1.4.168 se purificó primero mediante precipitación en medio ácido con ácido acético 2 N a un pH final de 4,75. Después de un tiempo de incubación de 15 min y centrifugación a 4°C y 13 000 rpm, el sobrenadante se tamponó a pH 7,0 con K_3PO_4 1 M. Después, el anticuerpo se purificó además mediante precipitación con sulfato de amonio (30,5 g/100 ml). Después de la centrifugación a 9000 rpm durante 30 minutos a 4°C , el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en citrato de Na 10 mM, NaCl 20 mM, pH 5,5. El anticuerpo se dializó a continuación frente a citrato de Na 10 mM, NaCl 20 mM, pH 5,5 y se centrifugó a 4°C , 13 000 rpm durante 30 minutos y se descartó el sedimento celular. El anticuerpo se purificó además mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna de SP Sepharose (GE Healthcare), se equilibró en citrato de Na 10 mM, NaCl 20 mM, pH 5,5. El anticuerpo se eluyó con un gradiente de NaCl de 20 mM a 250 mM en 6 volúmenes de columna. El material eluido se recogió con un colector de fracciones y las fracciones que contenían proteína se analizaron por HPLC y SDS-PAGE para identificar positivamente el anticuerpo. Las fracciones que contenían el anticuerpo se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración (Amicon Ultra MWCO de 10 kDa) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se dializaron frente a fosfato de potasio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.

b) Digestión con papaína para generar moléculas de Fab'₂

El anticuerpo purificado se escindió con 25 mU de papaína/mg de IgG a 37°C durante 80 min. La reacción se inactivó mediante la adición de 0,1 veces el volumen de reacción de acetamida de yodo 270 mM, fosfato de potasio 75 mM, de NaCl 150 mM y de EDTA 2 mM. Posteriormente, la mezcla de reacción se dializó frente a fosfato de potasio 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0. El Fab'₂ se purificó a continuación por cromatografía de intercambio iónico DEAE. La columna DEAE (GE Healthcare) se equilibró con fosfato de potasio 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7,0 y, después de cargar la mezcla de reacción dializada, el Fab'₂ se eluyó con fosfato de potasio 10 mM, NaCl 1 M, pH 7,0. Además, el Fab'₂ se purificó por cromatografía de inmunoafinidad como la fracción no adsorbida de una columna cargada con anticuerpos policlonales anti-papaína y posteriormente una columna cargada con anticuerpos policlonales contra M-Fcy. Se usó PBS como tampón de electroforesis. La fracción no adsorbida se concentró con un filtro centrífugo MWCO Amicon

Ultra de 10 kDa y la pureza se determinó mediante SDS-PAGE.

c) Reducción de Fab'₂ y generación de fragmentos Fab'

5 El Fab'₂ se redujo a 37 °C en un termomezclador (Eppendorf) en cisteamina 15 mM, fosfato de potasio 25 mM, EDTA 5 mM, pH 6,5 durante 60 minutos. La reacción se inactivó por separación del Fab' de la cisteamina en una cromatografía de exclusión por tamaño con filtración en gel en una columna Sephadex G25 P10 (GE Healthcare) equilibrada en fosfato de potasio 100 mM, EDTA 2 mM, pH 6,3. El Fab' se eluyó con KPO₄ 25 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5.

10

3.3 Marcado con ADN de fragmentos Fab'

15 El fragmento Fab' obtenido en el ejemplo 3.2 se conjugó con el derivado de maleimida marcado con ADN monocatenario (SEQ ID NO: 16) en una relación molar de 1:1 durante 20 min. Esta secuencia de ADN monocatenario es capaz de hibridar con la secuencia complementaria encontrada en el conector y el oligonucleótido adaptador, respectivamente. La reacción se inactivó mediante la adición de exceso de cisteína-HCl (para inactivar la maleinimida marcada con ADN no conjugada) seguido de la adición de *N*-metilmaleimida en exceso (inactivación de grupos Cisteína-SH libres). Posteriormente, el Fab' se dializó frente a Tris 20 mM, pH 7,6. El Fab' monomarcado se separó a continuación de Fab' polimarcado en una cromatografía de intercambio iónico con una columna Source Q (GE Healthcare). La columna se equilibró en Tris 20 mM pH 7,6 y los conjugados de Fab' y ADN se eluyeron con un gradiente de NaCl. El caudal fue de 2 ml/min y los conjugados de Fab' y ADN se eluyeron a una concentración de sal NaCl entre 400 y 700 mM. Se recogieron conjugados de Fab' y ADN monomarcados con un colector de fracciones y se concentraron por ultrafiltración (Amicon Ultra MWCO de 10 kDa) y se dializaron contra HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4.

20

3.4 Formación del agente de unión bivalente que comprende dos fragmentos Fab' anti-IGF1-R

25 El fragmento Fab marcado con el conector de ADN monocatenario del ejemplo 3.3, el ADN conector (SEQ ID NO: 17) y el ADN adaptador (SEQ ID NO: 18) se mezclaron en cantidades equimolares a temperatura ambiente para permitir la formación del fijador homodimérico bivalente (consúltese la figura 13). Después de una etapa de incubación de 1 minuto, la mezcla de reacción se analizó en una columna analítica de filtración en gel (Superdex™ 200, 10/300 GL, GE Healthcare). La concentración del conjugado de Fab' y DNA fue de 2,5 μM, la concentración de ADN-conector y ADN-adaptador fue de 1,25 μM cada uno.

3.5 Cromatografía analítica de exclusión por tamaño para investigar la formación del fijador dual

30 La cromatografía analítica de exclusión por tamaño se realizó usando una columna de cromatografía analítica de exclusión por tamaño GE Healthcare Superdex 200 10/300GL con un caudal de 0,5 ml/min. Se usó PBS como tampón de electroforesis y se inyectaron 100 μk de muestra en cada experimento. La formación del fijador dual mediante hibridación de ADN se estableció por diferencias en el tiempo de retención entre el conjugado de Fab' y ADN y el complejo ternario de Fab'-ADN, ADN conector y ADN adaptador (tabla 4). La formación de fijador dual más eficiente se observó con una relación 2:1:1 de Fab'-ADN, ADN conector y ADN adaptador.

35 El tiempo de retención se controló mediante un cambio en la absorbancia a 280 nm (absorbancia aromática) y 495 nm (absorbancia de fluoresceína).

Tabla 4: Cromatografía analítica de exclusión por tamaño del fijador dual frente al receptor de IGF1.

Muestra	tiempo de retención (min)
Conjugado de Fab' y ADN	30
ADN adaptador	32
ADN conector	32
Conjugado de Fab' y ADN + ADN conector	26
Conjugado de Fab' y ADN + ADN conector + ADN adaptador	22

40 El tiempo de retención se midió como la absorbancia máxima (280 nm) del pico resultante en el perfil de elución de cada experimento. Un complejo ternario de conjugado de Fab' y ADN, ADN conector y ADN adaptador se eluyó con un tiempo de retención más corto que los componentes individuales solos y el complejo de Fab'-ADN y ADN conector, lo que indica un mayor peso molecular y, por consiguiente, una formación de un complejo ternario.

55 3.6 Tinción inmunohistoquímica

Se transfectaron de forma estable células NIH3T3 para sobreexpresar el receptor de IGF1 humano. Las células transfectadas se fijaron e incluyeron en bloques de parafina de acuerdo con procedimientos estándar. Se produjeron cortes de 3 µm del bloque con un micrótopo (HM355S, Thermo Scientific) y se transfirieron a un portaobjetos para microscopio para tinción IHQ automatizada en el sistema Ventana BenchMark® XT. El procedimiento de tinción se realizó usando reactivos comercialmente disponibles de Ventana. Las células se desparafinaron y se trataron con tampón CC1 estándar (Ventana) para la recuperación de antígeno. 100 µl de 1 µg/ml de fijador dual, o fijador dual sin ADN adaptador, en tampón diluyente de anticuerpos (Ventana) se titularon manualmente en los portaobjetos y se incubaron durante 32 min. Las células se contratiñeron con 100 µl de hematoxilina II (Ventana) durante 4 min y 100 µl de reactivo azulado (Ventana) durante 8 min. La detección del fijador dual se basó en el kit de detección Xt iView DAB (Ventana) con la excepción de que el anticuerpo secundario biotinilado iView DAB del kit se sustituyó con tampón de reacción (Ventana) y, por lo tanto, solo el conjugado de estreptavidina y HRP del kit reconoció el ADN conector biotinilado. La tinción se analizó mediante microscopía óptica. Solo el fijador dual coloreó las células, mientras que el complejo de Fab'-ADN/ADN conector sin ADN adaptador (que no puede hibridar en un fijador dual) se separó por lavado y no coloreó las células positivas para el receptor de IGF1 (figura 14).

Análisis: Se inmunizaron ratones con un antígeno del receptor de IGF1 para el desarrollo de anticuerpos. El anticuerpo más prometedor, mAb 1.4.168, se caracterizó por resonancia de plasmones superficiales para propiedades cinéticas y especificidad. El anticuerpo se purificó a continuación, se escindió y se marcó con una secuencia de ADN de 17 mer. La hibridación entre Fab'-ADN, DNA conector y ADN adaptador se confirmó mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño y el fijador dual se utilizó a continuación en tinción IHQ automatizada (Ventana BenchMark® XT) en células transfectadas de forma estable. Solamente el fijador dual coloreó positivamente las células, mientras que el complejo de Fab'-ADN/ADN conector solo (sin ADN adaptador) se separó por lavado y, por lo tanto, no se coloreó. La unión cooperativa de ambos elementos de unión del fijador dual al receptor homodimérico más probablemente dio como resultado una estabilidad del complejo suficientemente alta para resistir el lavado riguroso en el instrumento de IHQ, lo que no ocurrió para el único elemento de unión solo (consúltese la figura 14).

Ejemplo 4:

Detección de heterodímeros HER2/HER3 con un fijador dual en inmunohistoquímica

La familia de receptores tirosina-cinásicos de los receptores HER consta de cuatro miembros: HER1, HER2, HER3 y HER4. Tras la unión del ligando, los receptores se dimerizan como homo- o heterodímeros de diversas maneras para desencadenar diferentes vías de transducción de señales, dependiendo del ligando y los niveles de expresión de cada uno de los cuatro miembros de la familia. Por ejemplo, HER3 sufre un cambio conformacional cuando se une a sus ligandos Neuregulina 1 (NRG1) o Neuregulina 2 (NRG2), respectivamente, y el dominio de dimerización de HER3 queda al descubierto y puede interactuar con otros receptores de Her. El dominio de dimerización está al descubierto constitutivamente en HER2HER2 y, por lo tanto, no necesita ser activado por un ligando específico para inducir su dimerización. En consecuencia, la estimulación de HER3 por NRG1 o NRG2 puede desencadenar su oligomerización con HER2HER2. Tras la dimerización, el dominio de tirosina-cinasa constitutivamente activo de HER2 fosforila HER3 que carece de un dominio de tirosina-cinasa funcional.

Se puede proporcionar un fijador dual para detectar el heterodímero de HER2/HER3. Los anticuerpos monoclonales contra HER3 y HER2 se desarrollan con una constante de velocidad de disociación dentro del intervalo definido en las reivindicaciones adjuntas. Además, los anticuerpos se validan en inmunohistoquímica para el reconocimiento de la diana en líneas celulares de cáncer, xenoinjerto y tejido tumoral. Los anticuerpos seleccionados se secuencian usando procedimientos de biología molecular estándar y se genera una biblioteca de fijadores duales usando la expresión de proteína recombinante. Los fijadores duales, con diferentes longitudes de conectores, se criban a continuación en células cancerosas fijadas con formol e incluidas en parafina. Antes de la inclusión, las células han sido privadas o han sido estimuladas con NRG1 humana para inducir la heterodimerización de HER2/HER3. La detección de la heterodimerización se evalúa en un sistema de tinción inmunohistoquímica automatizada (Ventana BenchMark® XT). Un resultado positivo en el cribado se define como un fijador dual que tiñe las células estimuladas (los dímeros HER2/HER3 presentes) pero no las células privadas (sin heterodímeros).

Desarrollo de anticuerpos monoclonales contra HER3 y HER2 dentro de un intervalo definido de la constante de velocidad de disociación

a) Inmunización de ratones

Se inmunizan ratones SJL, Balb/c y NMRI se con HER3(1242-1267) [KLH-MP-Cys-UZU-1243]amida y HER2(1223-1236)[KLH-MP-Cys-UZU]amida. La dosis de inmunización inicial es de 100 µg. Los ratones se inmunizaron además con 100 µg del inmunógeno después de 6 y 10 semanas.

b) Fusión y clonación

Las células del bazo de los ratones mencionados anteriormente se fusionan con células de mieloma de acuerdo con Galfre G., and Milstein C., Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46. En este proceso, 1×10^8 células de bazo del ratón

inmunizado se mezclan con 2×10^7 células de mieloma (P3x63-Ag8-653, ATCC CRL1580) y se centrifugaron durante 10 min a 250 g y 37 °C. El sobrenadante se descarta y el sedimento celular se suelta con un golpeteo. Se añade 1 ml de PEG (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) gota a gota en 1 minuto a 37 °C en un baño de agua. Posteriormente, se añaden gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin FCS en 5 minutos, seguidos de 10 ml adicionales de RPMI 1640 sin FCS, que se añaden gota a gota en 10 minutos. Como etapa siguiente, se añaden 25 ml de RPMI 1640 con FCS al 10 %, 100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina y 50 u de IL-6 y las células se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 60 min y a continuación se centrifugaron a 250 g durante 10 min. El sedimento celular se resuspende en 30 ml de RPMI 1640 con FCS al 10 %, 100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina y 50 u de IL-6, y se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂. La suspensión celular se transfiere a continuación a placas de 96 pocillos y se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂.

c) Aislamiento de inmunoglobulinas desde los sobrenadantes del cultivo celular

Después de cerca de 10 días, los cultivos primarios se someten a prueba para determinar la especificidad por el antígeno. Los cultivos primarios positivos se clonan en placas de cultivo celular de 96 pocillos por medio de un separador celular activado por fluorescencia. Después del crecimiento posterior en una placa de 24 pocillos, una placa de 6 pocillos y un matraz T75 (Corning) en medio Hyclone (Thermo Scientific) con suplementos de Nutridoma (Roche), las células de hibridoma que expresan el anticuerpo de baja afinidad deseado finalmente se cultivan en un biorreactor CeLLine (Integra biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

d) Caracterización biofísica de anticuerpos monoclonales

Las propiedades cinéticas de la interacción entre los anticuerpos monoclonales y HER2 o HER3 se investigan mediante cribado cinético por resonancia de plasmones superficiales usando la tecnología Biacore™.

Se utiliza un instrumento Biacore™ A100 bajo el control de la versión del programa informático V1.1. Se monta un chip Biacore™ CM5 en el instrumento y se dirige hidrodinámicamente y se acondiciona de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como tampón de migración se utiliza un tampón HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05 % (p/v)). Se inmoviliza un anticuerpo policlonal de captura de Fc de IgG anti-ratón de conejo a 30 µg/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) en las manchas 1, 2, 4 y 5 en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4 a 10 000 RU. El anticuerpo se inmoviliza de forma covalente a través de la química NHS/EDC. El sensor se desactiva después con una solución de etanolamina 1 M. Las manchas 1 y 5 se utilizan para la determinación y las manchas 2 y 4 se utilizan como manchas de referencia. Antes de la aplicación al chip sensor, los sobrenadantes de hibridoma que contienen mAb se diluyen 1:2 en tampón HBS-EP. La solución diluida se aplica a un caudal de 30 µl/min durante 1 minuto. Inmediatamente después, el analito, HER3(1242-1267)-Bi-PEG-amida humano (SEQ ID NO: 26) o HER2(1223-1236)-Bi-PEG-amida humano (SEQ ID NO: 25), injertado individualmente en estreptavidina, se inyecta a un caudal de 30 µl/min durante 2 min. A partir de entonces, la señal se registra durante un tiempo de disociación de 5 minutos. El sensor se regenera inyectando una solución de glicina-HCl 10 mM (pH 1,7) durante 2 min a un caudal de 30 µl/min. La constante de velocidad de disociación k_d (1/s) se calcula según un modelo de Langmuir utilizando el programa informático de evaluación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos monoclonales seleccionados interactúan con HER2, respectivamente HER3, con una constante de velocidad de disociación que se encuentra dentro de los límites de la reivindicación de la patente. Los anticuerpos tienen que unirse a su epítipo específicamente, es decir, el anticuerpo anti-HER2 no interactúa con HER3 y viceversa.

El anticuerpo seleccionado dirigido contra HER3 se denominó 7.2.32 (cadena pesada de región variable mostrada en SEQ ID NO: 19 y cadena ligera de región variable mostrada en SEQ ID NO: 20, respectivamente) y su constante de velocidad de disociación se determinó como $2,3 \times 10^{-4}$ 1/s y, por lo tanto, está dentro del intervalo requerido para el método del fijador dual. El anticuerpo seleccionado dirigido contra HER2 se denominó 4.1.43 (cadena pesada de región variable mostrada en SEQ ID NO: 21 y cadena ligera de región variable mostrada en SEQ ID NO: 22, respectivamente) y su constante de velocidad de disociación se determinó como $9,63 \times 10^{-4}$ 1/s y, por lo tanto, está dentro del intervalo requerido para el método del fijador dual.

Caracterización de anticuerpos monoclonales seleccionados en inmunohistoquímica.

Los anticuerpos monoclonales seleccionados contra HER2 y HER3 no solo tienen que unirse a su diana dentro de cierto intervalo de constante de velocidad de disociación, sino que también deben estar bien caracterizados en inmunohistoquímica para que sean adecuados como base del fijador dual. En primer lugar, debe garantizarse que ambos anticuerpos monoclonales aún reconocen sus antígenos en la inmunohistoquímica. Esto se puede lograr mediante la tinción de HEK293, fijado en formol e incluido en parafina, que sobreexpresa HER1, HER2, HER3 o HER4 recombinantes después de la transfección transitoria. Las tinciones deben realizarse con la plataforma de inmunohistoquímica automatizada Ventana BenchMark® utilizando el mismo protocolo para el anticuerpo anti-HER2 y anti-HER3. Por ejemplo, las tinciones podrían realizarse con el kit ultraview DAB con CC1Standard, tiempo de incubación de anticuerpos de 32 min a 37 °C, usando la opción de ultralavado y una contratinción con hematoxilina II durante 4 min y reactivo Blueing durante 8 min. Además, los anticuerpos deben validarse en xenoinjertos y tejidos tumorales con niveles de expresión de HER2 y HER3 conocidos usando el mismo protocolo de tinción. Además, las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera se obtienen a partir de los clones de hibridoma usando

procedimientos de biología molecular estándar.

Desarrollo de un fijador dual que reconoce HER2 y HER3

5 a) Desarrollo de fijador dual utilizando conectores peptídicos

Desarrollamos fijadores duales que consisten en dos fragmentos Fab que se conectan por un conector de unidades de glicina-glicina-glicina-glicina-serina (G4S) y una etiqueta de hemaglutinina (YPYDVPDYA) (figura 15). La longitud del conector puede cambiarse fácilmente incorporando diferentes números de unidades G4S en el conector. El conector puede contener entre dos y ocho unidades G4S. El fijador dual se expresa después de la expresión transitoria en células HEK293 usando un plásmido (fijador dual HC) que codifica una proteína de fusión de la cadena pesada de Fab_7.2.32-conector-Fab_4.1.43 (mostrada en SEQ ID NO: 24), y dos plásmidos que codifican las cadenas ligeras de los Fab. Todos los plásmidos codifican también una secuencia de transducción de señales para el transporte extracelular en dirección 5' de las secuencias que codifican anticuerpos. El uso de codones se optimiza para la expresión eucariota recombinante y el ADN correspondiente se sintetiza a continuación (Geneart) y se clona en un vector pUC usando sitios de restricción BamHI/XbaI. La secuencia conectora está flanqueada por sitios de restricción HindIII/KpnI para permitir el intercambio fácil de la secuencia conectora del plásmido usando procedimientos de biología molecular estándar.

Las células HEK293-F en suspensión se transfectan con los plásmidos para la expresión transitoria del fijador dual recombinante. En total, 50 ml de 1×10^6 células/ml con una viabilidad de > 90 % se transfectan con los plásmidos fijador dual-HC (que codifica la secuencia de proteína mostrada en SEQ ID NO: 24), LC_7.2.32 (que codifica la secuencia de proteína mostrada en SEQ ID NO: 20) y LC_4.1.43 (que codifica la secuencia de proteína mostrada en SEQ ID NO: 22) en una proporción de 1:1:1 usando el reactivo de transfección 293-Free™ (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células HEK293-F se incuban durante 7 días a 130 rpm, 37 °C y 8 % de CO₂. Las células se centrifugan a 4 °C, 8000 rpm durante 20 min. El sobrenadante que contiene el fijador dual se filtra además usando un sistema de filtración a vacío Steriflip (Millipore) de 0,22 µm, se alicuota y se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacena a 20 °C.

30 b) Desarrollo de fijadores duales utilizando conectores basados en ADN

Para generar fijadores duales basados en hibridación a través de conectores de ADN, los fragmentos Fab recombinantes se expresan como proteínas de fusión que codifican una secuencia de reconocimiento de escisión por sortasas (SEQ ID NO: 23). A continuación, las proteínas recombinantes se marcan en el sitio específico con moléculas de oligonucleótidos de 17 mer (oligonucleótido para marcado de 4.1.43 mostrado en SEQ ID NO: 27) y 19 mer (oligonucleótido para marcado de 7.2.32 mostrado en SEQ ID NO: 28) que luego pueden hibridar con la biblioteca disponible de ADN conector.

40 Conjugación de ADN y oligonucleótido utilizando la enzima sortasa en una reacción transpeptidasa

La enzima sortasa es una enzima procariota y proteolítica que también tiene una actividad transpeptidasa (Ton-That et al, PNAS 1999). En el presente documento, la enzima cataliza una reacción transpeptidasa entre un motivo LPXTG y un residuo de glicina que está unido al ADN-oligonucleótido.

Los fragmentos Fab recombinantes de 7.2.32 y 4.1.43 se expresan en células HEK293. 400 ml de 1×10^6 células HEK 293/ml con una viabilidad de > 90 % se transfectaron en una proporción 1:1 con los plásmidos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de 7.2.32 o 4.1.43 usando el reactivo de transfección 293-Free™ (Novagen) según las instrucciones del fabricante.

Las proteínas se expresan como proteínas de fusión y portan una etiqueta 6xHIS en el extremo C-terminal en la cadena ligera y una secuencia de escisión por sortasa en el extremo C-terminal en la cadena pesada de los fragmentos Fab. Además, 7.2.32 lleva una etiqueta HA en dirección 5' de la etiqueta de escisión por sortasa.

Después de la transfección, las células HEK293-F se incuban durante 7 días a 130 rpm, 37 °C y 8 % de CO₂. Las células se centrifugan a 4 °C, 8000 rpm durante 20 min. El sobrenadante, que contiene la proteína recombinante, se filtra además usando un sistema de filtración a vacío Steriflip (Millipore) de 0,22 µm.

Los fragmentos Fab se purifican por cromatografía en columna de afinidad con níquel y filtración en gel preparativa usando el sistema ÄKTA explorer FPLC usando procedimientos de purificación estándar. Se accedió a la pureza mediante SDS-PAGE y filtración analítica en gel.

El marcado se realiza con sortasa recombinante 10 µM, fragmento Fab 50 µM y oligonucleótido 200 µM en un tampón de Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, a 37 °C durante la noche. A continuación, la reacción de marcado se diluye 10 veces en Tris 20 mM pH 8,0 y se aplica a una columna de intercambio iónico Resource Q (GE Healthcare) que se equilibra en Tris 20 mM, pH 8,0. El oligonucleótido y el oligonucleótido-fragmentos Fab fuertemente cargados negativamente se eluyen con un gradiente alto de sal de Tris 20 mM, pH 8,0 y NaCl 1 M, y de este modo se separan

de la sortasa y el fragmento Fab no marcado que eluye a baja concentración de sal. La elución se controla siguiendo la absorbancia a 495 nm, detectando el marcador de fluoresceína del oligonucleótido. Las fracciones eluidas que contienen oligonucleótico y Fab-Oligonucleótido se mezclan y el Fab-Oligonucleótido se separa del oligonucleótido no conjugado por filtración en gel preparativa en una columna HiLoad 16/60 columna Superdex 200 (GE Healthcare) usando Tris 20 mM 8.0, NaCl 200 mM como equilibrado y tampón de electroforesis. La pureza del producto final se evalúa usando filtración analítica en gel y SDS-PAGE y solo se usará un producto final puro > 90 % en el ensamblaje de los fijadores duales.

El ensamblaje del fijador dual se investiga mediante filtración analítica en gel.

Los conjugados 7.2.32-Fab-19 mer y 4.1.43-Fab-17 mer en una relación equimolar se mezclan en experimentos individuales con cada una de las moléculas conectoras (conector 3-14 que se muestran en el ejemplo 2.4. El ensamblaje del fijador dual se investiga luego usando filtración analítica en gel.

La cromatografía analítica de exclusión por tamaño se realiza usando una columna de cromatografía analítica de exclusión por tamaño GE Healthcare Superdex 200 10/300GL con un caudal de 0,5 ml/min. Se usa Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM como tampón de electroforesis y se inyectan 100 µl de muestra en cada experimento. La concentración de los conjugados de Fab y oligonucleótido y el conector es 2,5 µM. El tiempo de retención se controla mediante un cambio en la absorbancia a 280 nm (absorbancia aromática) y 495 nm (absorbancia de fluoresceína). La formación del fijador dual mediante hibridación de ADN se establece por diferencias en el tiempo de retención entre el conjugado de Fab y oligonucleótido, el complejo Fab-oligonucleótido y conector, y el complejo ternario de los dos fragmentos Fab y el conector.

Generación de células MCF-7 fijadas en formol e incluidas en parafina

Se sabe que la línea de células cancerosas MCF-7 expresa niveles intermedios de HER2 y HER3, pero no HER1 (DeFazio et al, *Int. J. Cancer*, 87, 487-498 (2000)) y, por lo tanto, es un modelo de estudio preferente para detectar la inducción de la heterodimerización de HER2/HER3. Además, los heterodímeros HER2/HER3 ya se han estimulado detectado en células MCF-7 usando otros procedimientos (Mukherjee et al, *PLOS One* 6(1), 2011).

Las células MCF-7 se cultivan usando RPMI 1640 (Gibco) con L-glutamina 2 mM (Gibco) y FCS al 10 % y se cultivan hasta confluencia óptica en un matraz T175cm². Las células confluentes se privan de alimento en RPMI 1640, L-Glutamina 2 mM sin FCS durante aproximadamente 18 horas. Las células se estimulan a continuación con NRG1-β1 20 nM (Peprotech) durante 15 minutos a 37 °C. Como control negativo, las células se dejan sin estimulación durante 15 minutos a 37 °C en medio de cultivo de células frescas sin FCS. Las células se fijan con formol y se incluyen en parafina como se describe (Defazio-Eli et al, *Breast Cancer Res* 13(2):R44 (2011).

Dado que la fosforilación de HER3 solo ocurre después de la unión del ligando, una tinción de HER3 fosforilada debería mostrar una diferencia en el estado de activación de HER3 entre células MCF-7 tratadas y no tratadas que también pueden indicar diferentes niveles de heterodimerización de HER2/HER3. La estimulación de HER3 por NRG1-β1 se valida en las células MCF-7 fijadas en formol e incluidas en parafina con tinciones inmunohistoquímicas usando el anticuerpo 21D3 (Cell Signaling) que es específico para HER3 fosforilado. La tinción inmunohistoquímica manual se realiza utilizando tampón EDTA (Thermo Scientific) para la recuperación de antígenos y el sistema de detección de gran volumen Ultra Vision LP (Thermo Scientific) para la detección de antígenos con el cromógeno DAB (Dako) de acuerdo con los protocolos estándar. Solo las células MCF-7 estimuladas con NRG1-β1 se tiñen positivamente para HER3 fosforilado y las células no estimuladas se tiñen negativamente.

Detección de heterodímeros de HER2/HER3 en células MCF-7

Las tinciones inmunohistoquímicas se realizan en un sistema Ventana BenchMark® XT. La detección de fijadores duales con conectores peptídicos se produce a través del «anticuerpo puente» anticuerpo anti-HA-Tag C29F4 (Cell Signaling). La parte Fc del anticuerpo anti-HA-Tag se detecta utilizando el kit de detección Optiview DAB (Ventana). La señal de detección puede amplificarse utilizando el kit de amplificación Optiview (Ventana). La detección de fijadores duales con conectores basados en ADN se produce a través del «anticuerpo puente» descrito anticuerpo anti-HA-Tag C29F4 (que se dirige con el HA-Tag en el extremo C de la cadena pesada de 7.2.32), o mediante el marcador de biotina de la molécula conectora que puede servir como etiqueta de detección para el kit de detección iVIEW DAB basado en estreptavidina (Ventana). La biblioteca de fijadores duales se prepara en experimentos individuales mezclando 7.2.32-Fab-19 mer y 4.1.43-Fab-17 mer en una proporción equimolar con cada uno de los conectores (conector 3-14) que se muestran en el ejemplo 2.4.

Se producen cortes de 3,5 µm de los bloques de células MCF-7 usando un micrótopo (HM355S, Thermo Scientific) y se transfieren a un portaobjetos de microscopio. En el sistema de tinción automatizado BenchMark® XT, las células se desparafinan y se tratan con tampón CC1 durante 32 min para la recuperación de antígenos. Para el cribado, cada fijador dual se diluye en diluyente de anticuerpo Ventana y 100 µl se aplican manualmente a los portaobjetos en diferentes diluciones entre 1:1 y 1:1000, y se incuban durante 16 min a 37 °C. El anticuerpo anti-HA-Tag C29F4 (Cell Signaling) se diluye 1:400 en diluyente de anticuerpo Ventana y se transfiere a un dispensador. El anticuerpo anti-HA

5 tiene la función de un «anticuerpo puente» ya que se une a la etiqueta HA del fijador dual y, al mismo tiempo, su parte Fc se puede detectar usando el sistema de detección anti-conejo del kit de detección Ventana Optiview Kit. Como fijador posterior, se aplican 100 µl del anticuerpo puente y se incuban durante 32 min. A continuación, los reactivos de detección y amplificación Optiview se aplican de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La tinción se analiza en microscopio de campo brillante.

10 Un resultado positivo del cribado es un fijador dual que solo tiñe las células MCF-7 tratadas con NRG1-β1 con la heterodimerización de HER2/HER3 inducida y no tiñe el control negativo de las células MCF-7 no tratadas (solo monómeros de HER2 y HER3) Además, la tinción se inhibe mediante la adición de péptidos del epítipo, 25 µg/ml de HER2(1223-1236), mostrado en SEQ ID NO: 25, o 25 µg/ml de HER3(1242-1267), mostrado en SEQ ID NO: 26, para inhibir uno de los dos sitios de unión del fijador dual ya que los heterodímeros de HER2/HER3 solo deberían ser detectables si ambos brazos del fijador dual son de libre acceso.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Detección de un dímero polipeptídico por un agente de unión bivalente

<130> 27514 WO-WN

10 <150> EP 10196687.7
<151> 2010-12-23

<150> EP 11173844.9
<151> 13/07/2011

15 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 122
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25 <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

30 <210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

35

ES 2 656 969 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Leu Gly
 115

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

<400> 3

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

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

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

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

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

10 Met Glu Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Ile Tyr Ala Tyr Asp His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 4
 <211> 106
 <212> PRT

ES 2 656 969 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 19

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN monocatenario 19mer

15 <400> 5

agtctattaa tgctctgc

19

<210> 6

<211> 17

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN monocatenario 17mer

25 <400> 6

agttctatcg tcgtcca

17

<210> 7

<211> 19

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> ADN monocatenario complementario 19mer

<400> 7

gcagaagcat taatagact

19

40 <210> 8

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN monocatenario complementario 17mer

5 <400> 8
 tggacgacga tagaact 17

<210> 9
 <211> 33
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(17)
 <223> bAla

20 <400> 9

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

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

Glu

25 <210> 10
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (16)..(17)
 <223> Ácido amino-trioxa-octanoico (X representa
 Ácido amino-trioxa-octanoico)

<400> 10

40

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

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

<210> 11
 <211> 27
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

50 <400> 11

<220>
 <223> oligonucleótido

5 <400> 16
 acctgctgct atcttga 17

<210> 17
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido conector

15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Y representa timidina biotinilada

20 <400> 17
 gcagaagcat taatagacyt ggacgacgat agaact 36

<210> 18
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido adaptador

30 <220>
 <221> misc_feature
 <223> en la que C3 representa

35 <220>
 <221> misc_feature
 <223> en la que C3 representa un propano diol espaciador

<400> 18
 40 gtctattaat gcttctgcct ggacgacgat agaact 36

<210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 45 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 7.2.32 cadena pesada de la región variable

50 <400> 19

ES 2 656 969 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser
115 120

5 <210> 20
<211> 110
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <220>
<221> misc_feature
<223> 7.2.32 cadena ligera de la región variable

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

ES 2 656 969 T3

<211> 111
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 04/01/1943 cadena pesada de la región variable

<400> 21

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

15 <210> 22
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> 04/01/1943 cadena ligera de la región variable

25 <400> 22

ES 2 656 969 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 12
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

10 <220>
<221> misc_feature
<223> Escisión para sortasa-Etiqueta

15 <400> 23

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

20 <210> 24
<211> 481
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Fijador dual, construcción HC

<220>
<221> Fab HC 7.2.32
<222> (1)..(252)

30 <220>
<221> GGGGS
<222> (253)..(257)
<223> Motivo de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (= GGGGS o G4S)
35 está presente = 1, 2, 3 o 4 veces.

<220>
<221> Etiqueta de hemaglutinina
<222> (258)..(266)

40 <220>
<221> GGGGS

ES 2 656 969 T3

<222> (267)..(271)

<223> Motivo de la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (= GGGGS o G4S) está presente = 1, 2, 3 o 4 veces.

5 <220>

<221> Fab HC 04/01/1943

<222> (272)..(481)

<400> 24

10

Met Gly Leu Phe Cys Ser His Pro Gly Asp Pro Leu Ala Thr Thr Met
1 5 10 15

Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val
20 25 30

His Ser Glu Phe Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
35 40 45

ES 2 656 969 T3

Gln Pro Lys Gly Ser Leu Gln Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
50 55 60

Phe Asn Thr Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
65 70 75 80

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Glu Ser Ser Asp Tyr Ala Thr
85 90 95

Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp
100 105 110

Ser Gln Asn Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp
115 120 125

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val Arg Ser Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
130 135 140

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ser Lys Thr Thr Pro Pro Ser
145 150 155 160

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
165 170 175

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val
180 185 190

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala
195 200 205

Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
210 215 220

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro
225 230 235 240

Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Lys Leu Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Thr Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly
275 280 285

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Pro Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
290 295 300

ES 2 656 969 T3

Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Glu Lys Ser Leu Glu Trp
305 310 315 320

Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Lys Asn Gly Ile Ile Ser Tyr Asn Gln Lys
325 330 335

Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Arg Thr Ala
340 345 350

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
355 360 365

Cys Ala Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
385 390 395 400

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
405 410 415

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
420 425 430

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
435 440 445

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
450 455 460

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
465 470 475 480

Ile

<210> 25

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Her2 humano (1223-1236)

<400> 25

Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr

1 5 10

15

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> misc_feature

<223> Her3 humano (1242-1267)

25

<400> 26

REIVINDICACIONES

1. Un agente de unión bivalente de fórmula I
- 5 A-a':a-S-b:b'-B (fórmula I),
 siendo el agente de unión bivalente capaz de unirse a un dímero polipeptídico, consistiendo el dímero en dos cadenas polipeptídicas asociadas,
- 10 a) en la que A es un primer fijador monovalente, que se une a un único epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero, en la que B es un segundo fijador monovalente, que se une a un único epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero,
- 15 b) en la que cada fijador monovalente A y B se selecciona del grupo que consiste en un péptido, un péptido mimético, un aptámero, un *spiegelmer*, una darpina, una lectina, una proteína con repeticiones de anquirina, un dominio de tipo Kunitz, un anticuerpo de dominio único y un fragmento monovalente de un anticuerpo, y tiene una K_{diss} en el intervalo de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$,
- 20 c) en la que cada uno de a':a y b:b' es independientemente un par de unión, en el que a':a y b:b' son diferentes, en la que S es un espaciador, en la que - representa un enlace covalente,
- d) en la que a - S - b es un conector que tiene una longitud de 6 a 100 nm,
- 25 e) en la que los miembros de los pares de unión a':a y b:b' son secuencias de ácidos nucleicos hibridantes, y
- f) en la que el agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos.
2. El agente de unión bivalente de la reivindicación 1, en el que al menos uno de los fijadores monovalentes es un anticuerpo monocatenario, o un fragmento Fab o un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal.
- 30 3. El agente de unión bivalente de la reivindicación 1, en el que los dos fijadores monovalentes se derivan de anticuerpos monoclonales y son fragmentos Fab, o fragmentos Fab', o un fragmento Fab y un fragmento Fab'.
- 35 4. El agente de unión bivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente de unión bivalente tiene una K_{diss} de $10^{-5}/s$ o menos.
5. El agente de unión bivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el conector es un conector de L-ADN.
- 40 6. Un procedimiento para formar un agente de unión bivalente que se une específicamente a un dímero polipeptídico, consistiendo el dímero en dos cadenas polipeptídicas asociadas, comprendiendo el procedimiento las etapas de
- 45 a) seleccionar un primer fijador monovalente seleccionado del grupo que consiste en un péptido, un péptido mimético, un aptámero, un *spiegelmer*, una darpina, una lectina, una proteína con repeticiones de anquirina, un dominio de tipo Kunitz, un anticuerpo de dominio único y un fragmento monovalente de un anticuerpo, que se une a un único epítipo de un primer polipéptido diana comprendido en dicho dímero con una K_{diss} de entre $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$,
- 50 b) seleccionar un segundo fijador monovalente seleccionado del grupo que consiste en un péptido, un péptido mimético, un aptámero, un *spiegelmer*, una darpina, una lectina, una proteína con repeticiones de anquirina, un dominio de tipo Kunitz, un anticuerpo de dominio único y un fragmento monovalente de un anticuerpo, que se une a un único epítipo de un segundo polipéptido diana comprendido en dicho dímero con una K_{diss} de $5 \times 10^{-3}/s$ a $10^{-4}/s$,
- 55 c) acoplar el primer fijador monovalente a un miembro de un primer par de unión de secuencias de ADN hibridantes y el segundo fijador monovalente a un miembro de un segundo par de unión de secuencias de ADN hibridantes, en la que el primer y el segundo par de unión no interfieren entre sí, y un conector que tiene una longitud de 6 a 100 nm y que comprende un espaciador y los miembros del par de unión complementarios al primer y al segundo miembro del par de unión, respectivamente, se coincuban, formándose de este modo un agente de unión bivalente.
- 60 d) seleccionar un agente de unión bivalente que tenga un valor de K_{diss} de $3 \times 10^{-5}/s$ o menos,
 formando de este modo un agente de unión bivalente que se une específicamente al dímero polipeptídico.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho conector es L-ADN.
- 65 8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7 que comprende además la etapa e) de aislar el agente de unión bivalente.

9. El agente de unión bivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el dímero polipeptídico es un homodímero.
- 5 10. El agente de unión bivalente de acuerdo con la reivindicación 9, en el que ambos fijadores monovalentes se unen a un epítipo solapante.
11. El agente de unión bivalente de acuerdo con la reivindicación 9, en el que ambos fijadores monovalentes se unen al mismo epítipo.
- 10 12. El agente de unión bivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el dímero polipeptídico es un heterodímero.
13. Un procedimiento de tinción histológica para un dímero polipeptídico, comprendiendo el procedimiento las etapas de
- 15 a) proporcionar una muestra celular o tisular,
- b) incubar dicha muestra con un agente de unión bivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y
- 20 c) detectar el agente de unión bivalente, tiñendo de ese modo dicha muestra para la detección del dímero polipeptídico.
14. Uso de un agente de unión bivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la tinción de una muestra celular o tisular.
- 25

Fig. 1

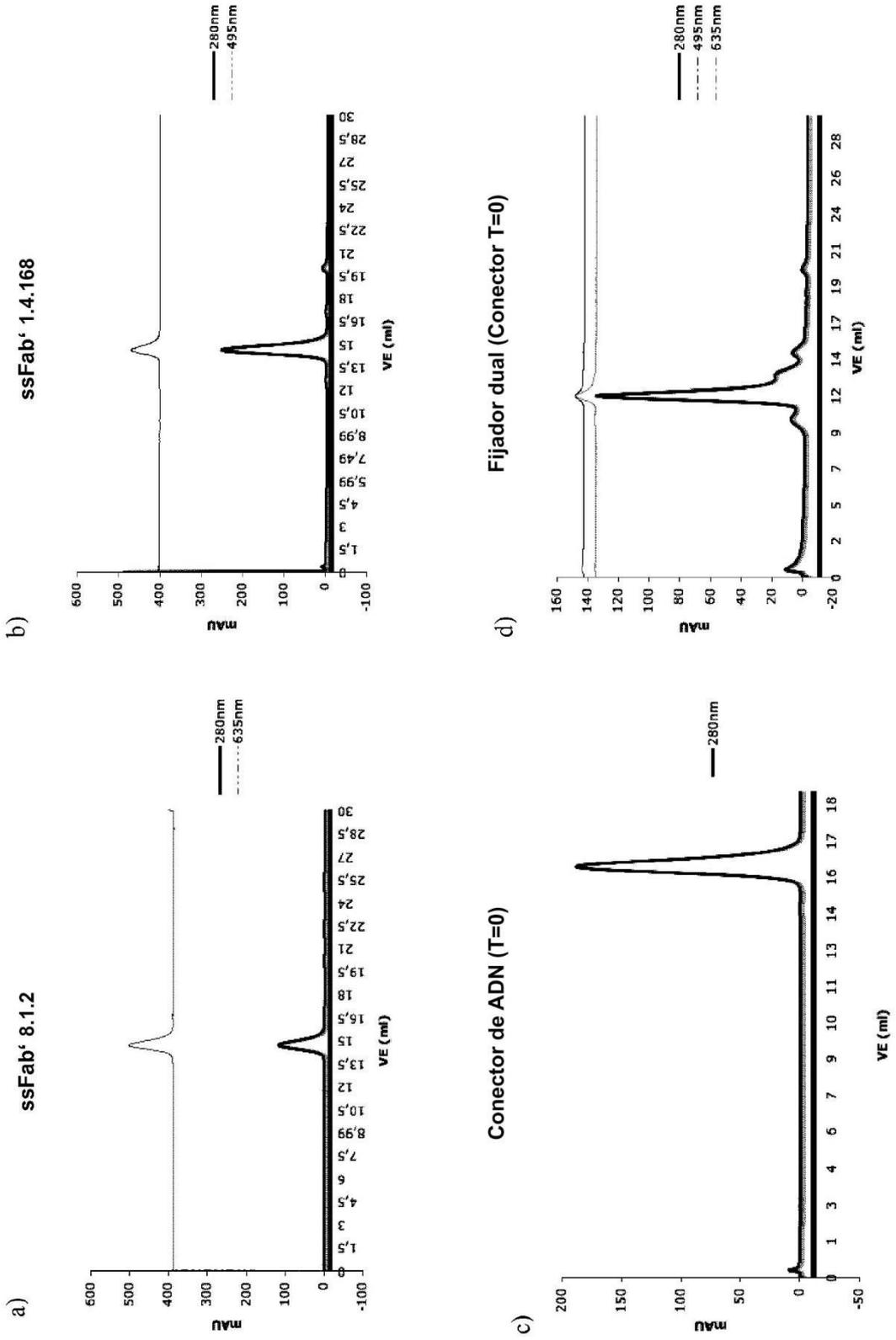


Fig. 2

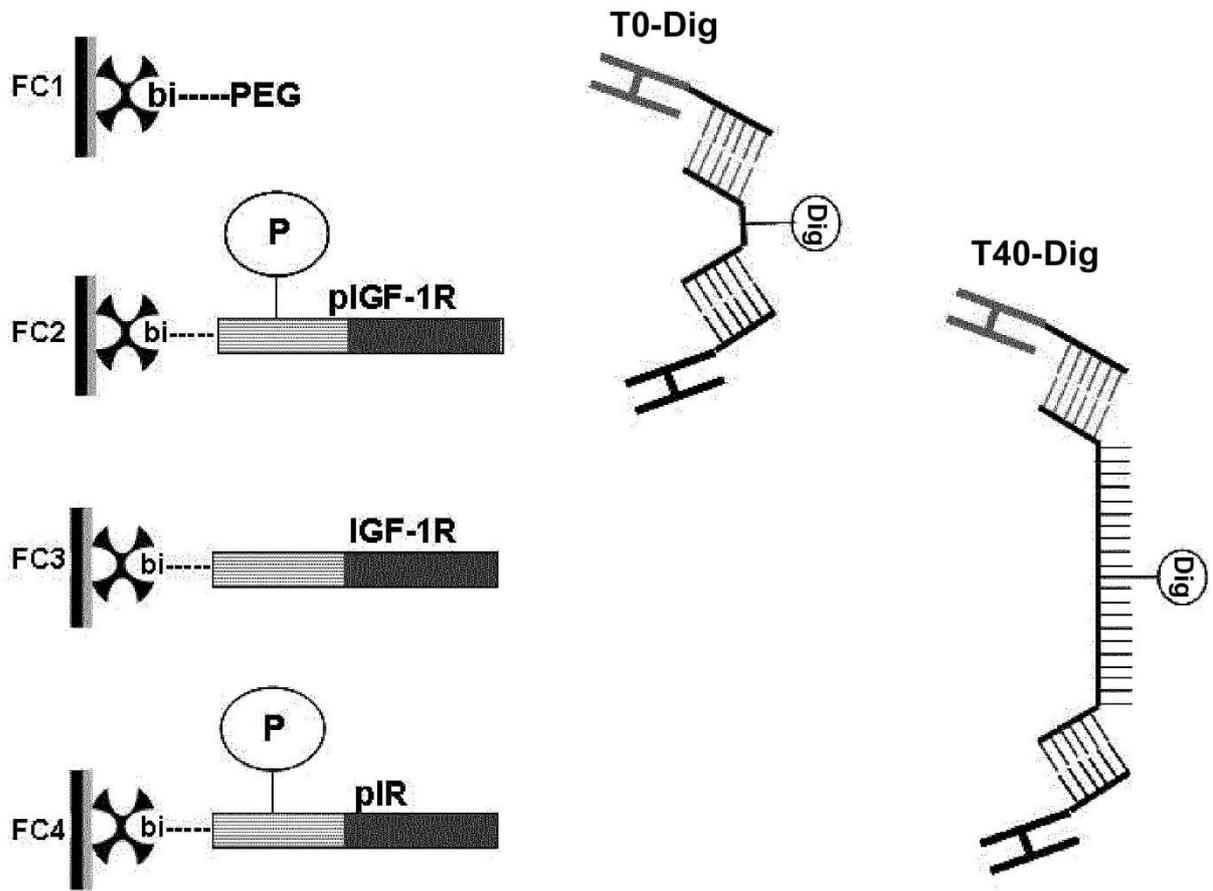


Fig. 3

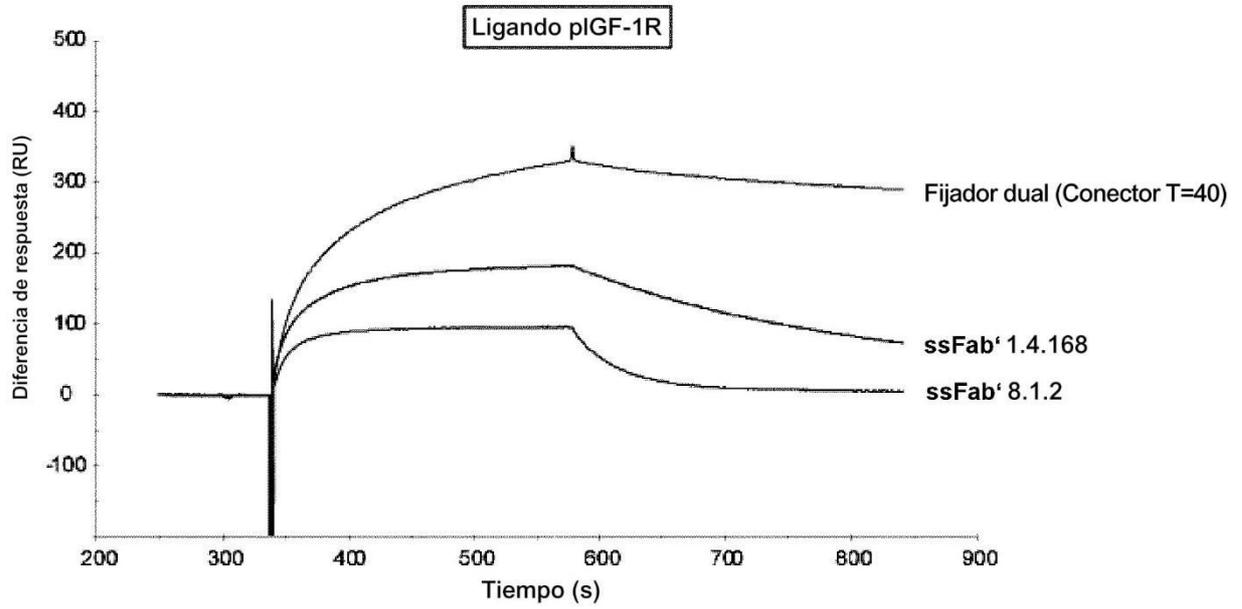


Fig. 4

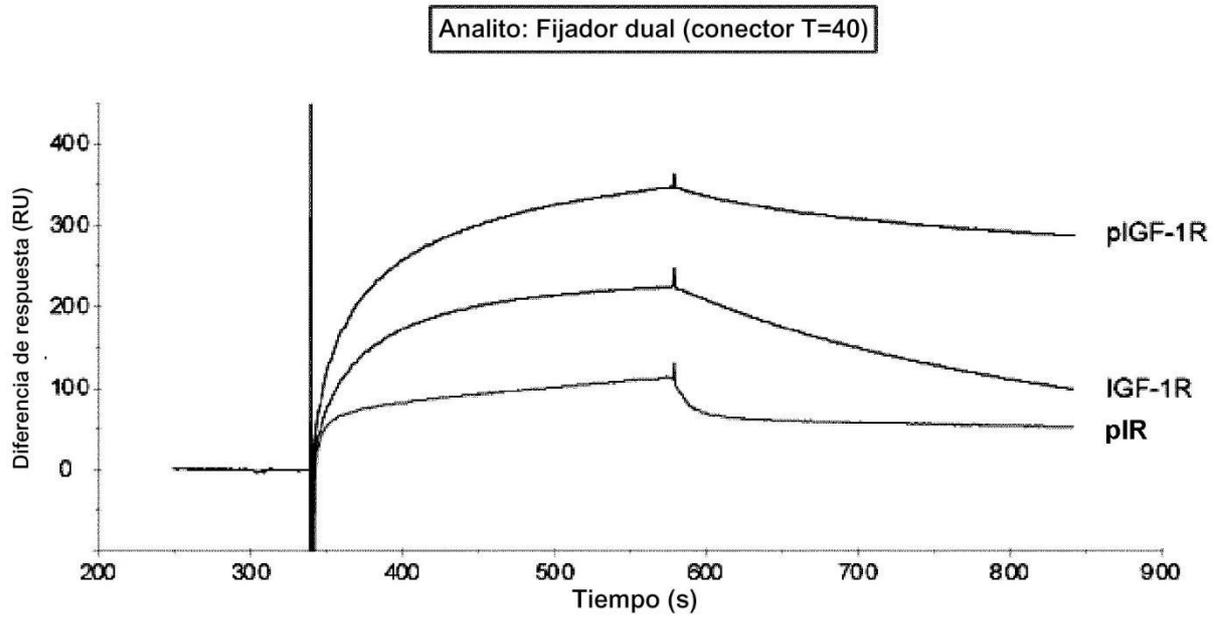


Fig. 5

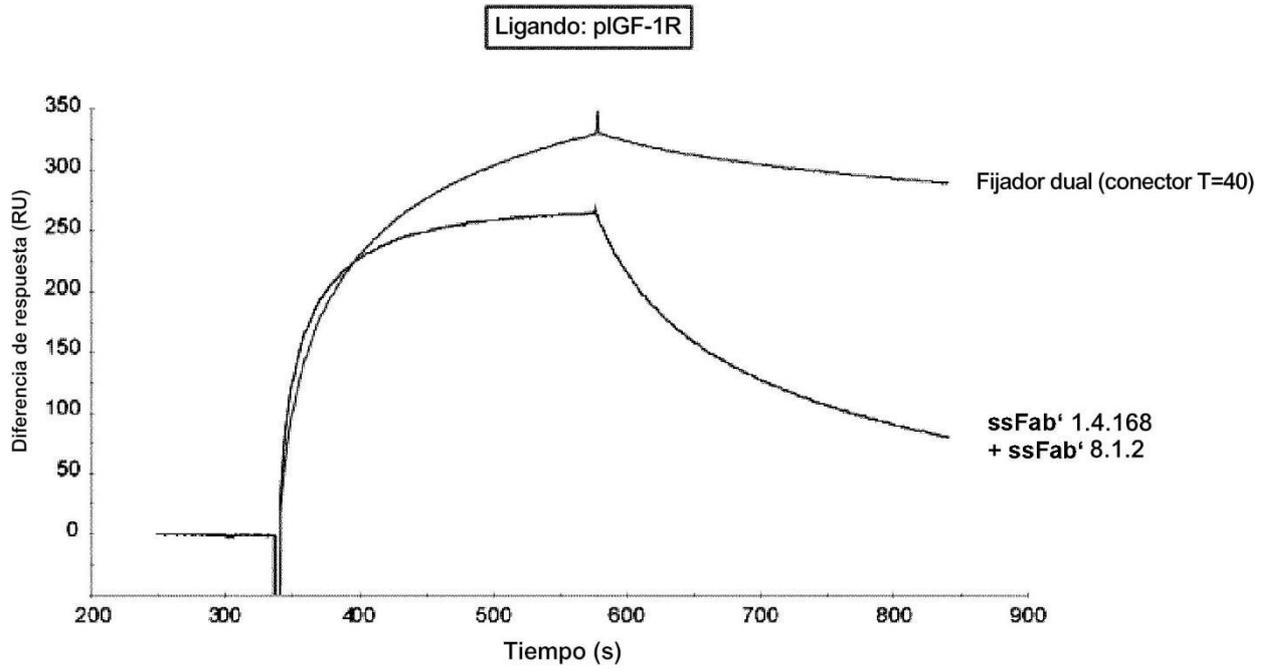


Fig. 6

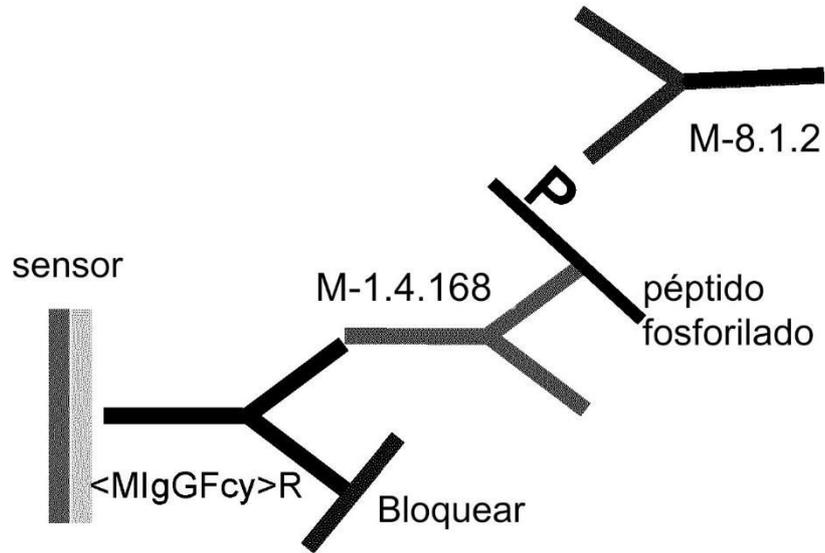


Fig. 7

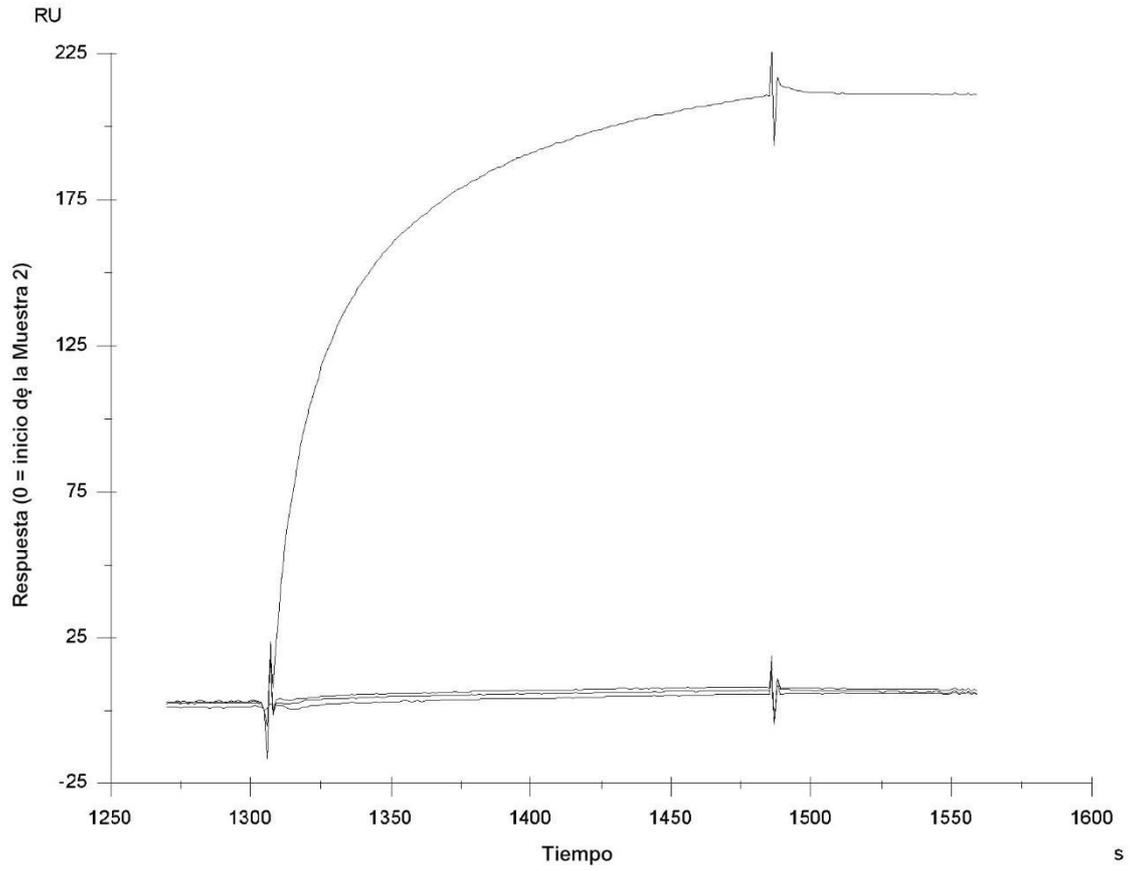


Fig. 8

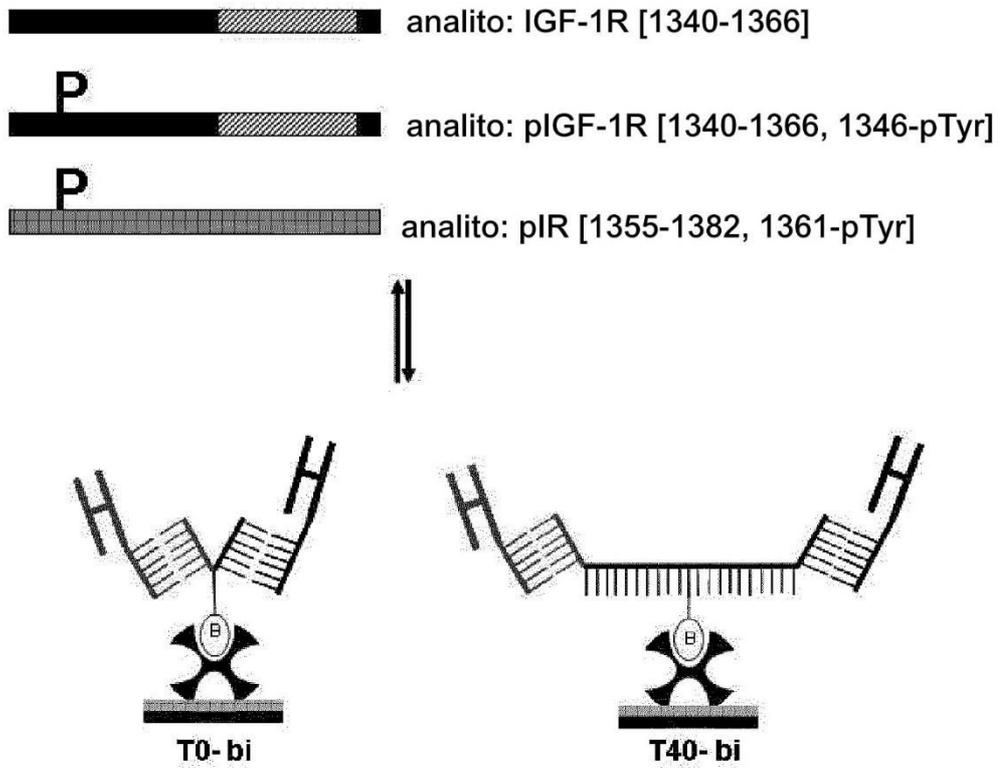


Fig. 9

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

Fig. 10

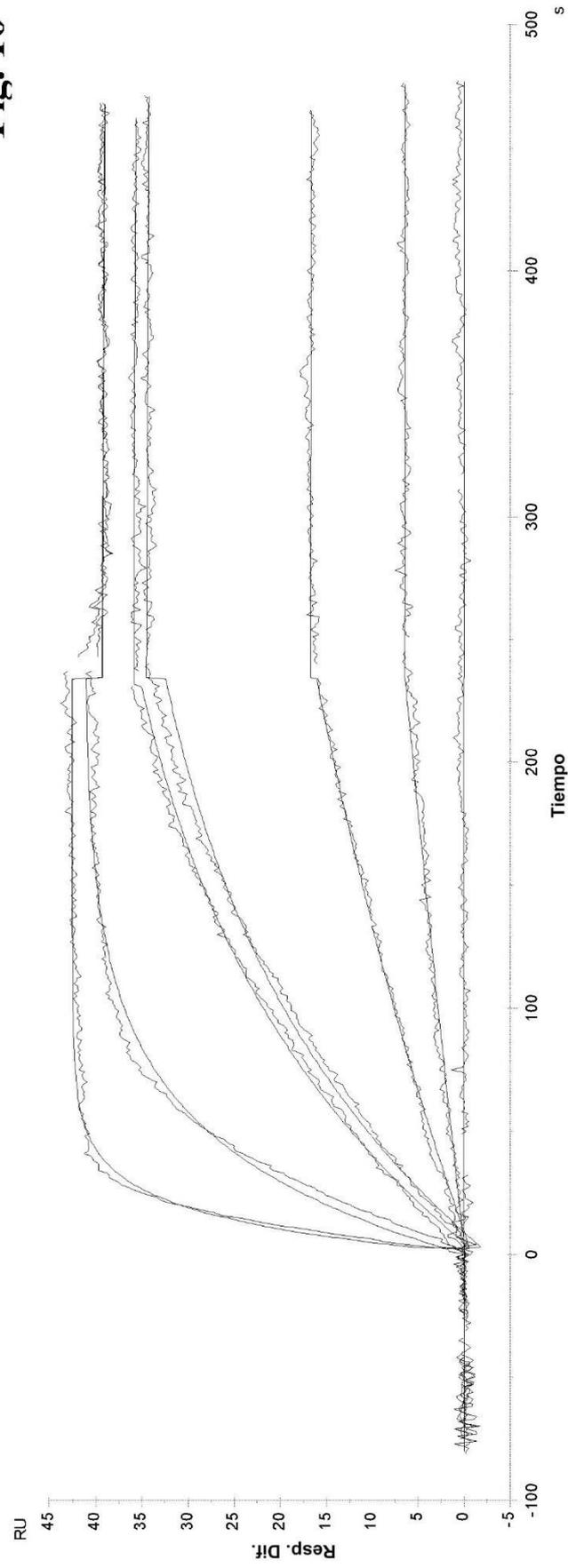


Fig. 11

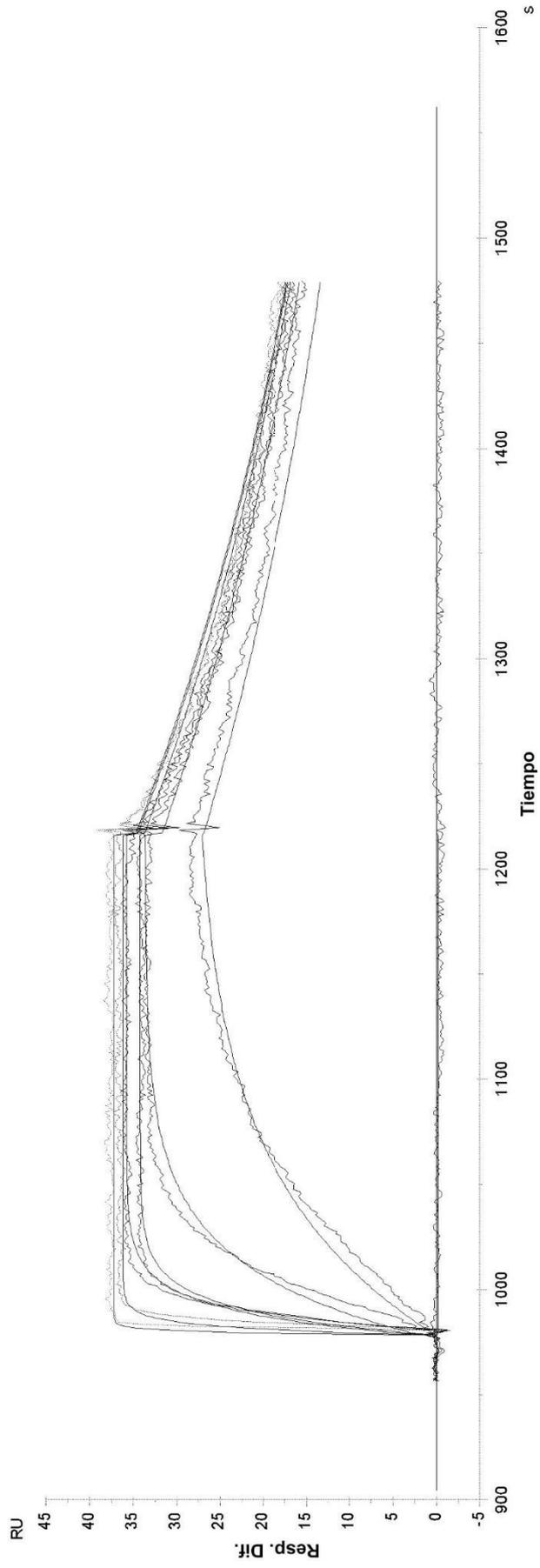


Fig. 12

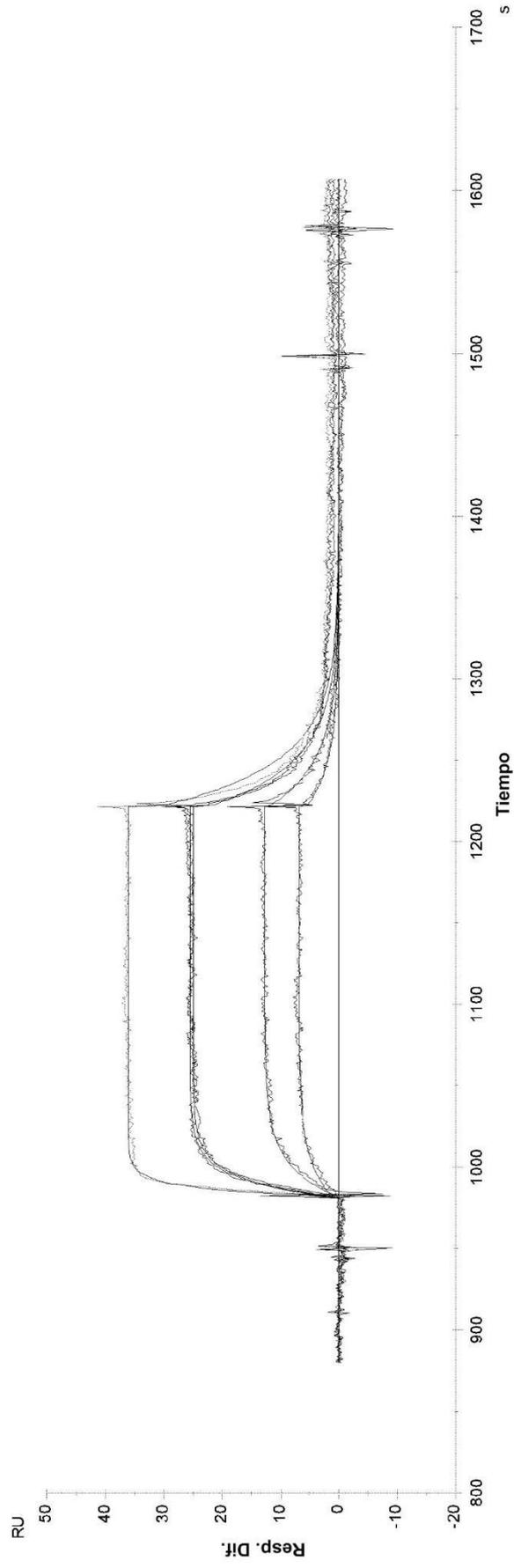


Fig. 13

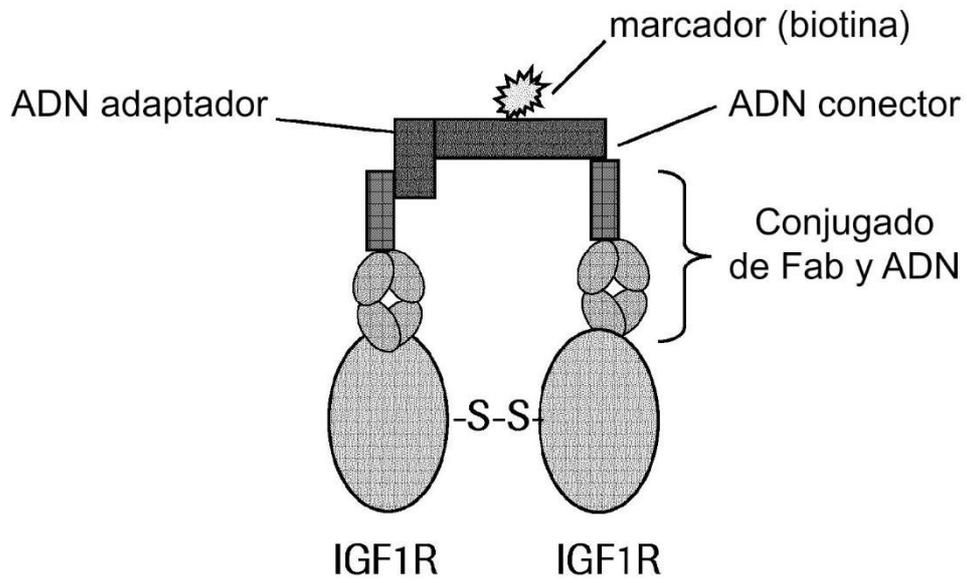
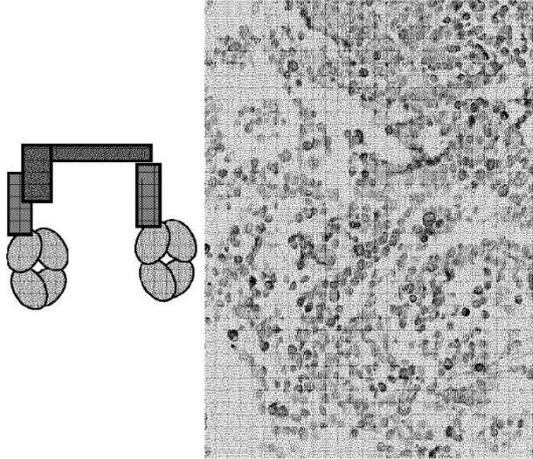


Fig. 14

A



B

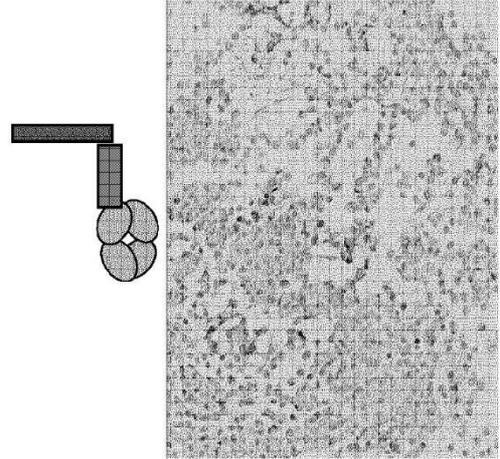


Fig. 15

