

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 883**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/GB2011/050613**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11117653**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11730048 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2550297**

54 Título: **Moléculas de DVD-LG estabilizadas con disulfuro**

30 Prioridad:

**25.03.2010 GB 201005062**  
**25.03.2010 GB 201005061**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.06.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HEYWOOD, SAM, PHILIP y**  
**HUMPHREYS, DAVID, PAUL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 717 883 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

Moléculas de DVD-LG estabilizadas con disulfuro

## Descripción

5 La presente descripción se refiere a anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno en un formato con estabilidad adecuada y que se pueden expresar a niveles adecuados para ser comercialmente viables.

Son conocidos los anticuerpos multivalentes. Wu Chengbin y cols. en Nature Biotechnology vol. 25, nº. 11, noviembre 2007, páginas 1290 a 1297 describen la detección simultánea de múltiples mediadores de enfermedad mediante inmunoglobulinas de dominio variable dual.

10 Wu Chengbin y cols. en MABS, vol. 1, nº. 4, julio 2009, páginas 339 a 347 describen la construcción molecular y la optimización de moléculas de inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig™) anti-IL-1 alfa/beta humana.

Reiter Y y cols. en Nature Biotechnology, vol. 14, 1 de octubre de 1996, páginas 1239 a 1245 describen el diseño por ingeniería genética de fragmentos Fv de anticuerpo para la detección y el tratamiento del cáncer: fragmentos Fv estabilizados con disulfuro.

15 Sin embargo, aunque se describió el concepto básico hace algunos años, ha habido dificultades prácticas asociadas con el aprovechamiento de la tecnología y, por lo tanto, no se ha adoptado ampliamente para la preparación de productos farmacéuticos biológicos en desarrollo.

20 Un formato de anticuerpo no natural/no nativo puede ser muy difícil de expresar, lo que puede aumentar significativamente el coste de los productos a un nivel insostenible. Los formatos pueden aumentar la inmunogenicidad o reducir la estabilidad *in vivo* en comparación con un anticuerpo o fragmento estándar y/o pueden tener una farmacocinética no deseada.

En particular, los problemas asociados con la preparación de productos homogéneos han sido una preocupación para los formatos no naturales. Si, por ejemplo, hay más de una permutación para combinar los componentes monómeros, entonces pueden surgir mezclas. Por lo tanto, se pueden requerir métodos de purificación elaborados para aislar la entidad deseada/diana a niveles de pureza satisfactorios.

25 Esto se ha abordado de varias maneras, por ejemplo, se dijo que el uso de enlazadores cortos en la producción de anticuerpos biespecíficos ayuda a la dimerización apropiada. Sin embargo, los datos han demostrado que la orientación de los dominios variables puede influir en la expresión del formato y en la formación de sitios de unión activos.

30 Un abordaje para forzar el ensamblaje en la disposición u orientación deseadas se conoce como método de "pomo en el orificio", en el que se introduce un gran "pomo" en el dominio VH, por ejemplo, en algunos anticuerpos cambiando la valina 137 con el residuo grande de fenilalanina y reemplazando la leucina 45 con triptófano. Se puede introducir un hueco complementario, por ejemplo, en el dominio VL, en algunos anticuerpos, mutando la fenilalanina 98 a metionina y el triptófano 87 a alanina. Sin embargo, se observó una actividad de unión al antígeno reducida para varios constructos.

35 El documento WO2007/024715 intenta abordar uno o más de estos problemas proporcionando un anticuerpo multiespecífico multivalente (DVD-Ig) del tipo mostrado en la Fig. 1.

Los DVD-Igs se caracterizan porque el dominio variable del Va está directamente unido al dominio variable Vb, por ejemplo, mediante un aminoácido o péptido.

Estos formatos tras la expresión pueden formar agregados solubles en vehículos líquidos que pueden ser problemáticos al formular un agente bioterapéutico.

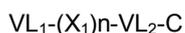
40 La presente invención proporciona un formato multivalente estable que se cree que es capaz de expresarse en un huésped con un perfil de estabilidad adecuado.

Por lo tanto, se proporciona una molécula de anticuerpo que comprende:



45 en donde VH<sub>1</sub> es un primer dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo, VH<sub>2</sub> es un segundo dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo, CH es un CH<sub>1</sub> es un dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo, X<sub>1</sub> representa un péptido, X<sub>2</sub> representa una región Fc del anticuerpo, n es 0 o 1 e y es independientemente 1 o 2, y

una cadena ligera polipeptídica que comprende:



en donde VL<sub>1</sub> es un primer dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo, VL<sub>2</sub> es un segundo dominio variable

de la cadena ligera del anticuerpo, C es un dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo,  $X_1$  representa un péptido y n es 0 o 1,

en donde la cadena pesada y la cadena ligera están alineadas de manera que  $VH_1$  y  $VL_1$  forman un primer dominio de unión y  $VH_2$  y  $VL_2$  forman un segundo dominio de unión, en donde:

5 en donde hay un enlace disulfuro entre  $VH_1$  y  $VL_1$ ; y

en donde el enlace disulfuro está entre los residuos de cisteína  $VH_{44}$  y  $VL_{100}$  numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.

10 El enlace disulfuro entre  $VH_1$  y  $VL_1$  parece ayudar a la estabilidad general de las moléculas. Después de la expresión y cualquier purificación esta aumentada estabilidad puede, por ejemplo, manifestarse en ausencia de agregación en formulaciones líquidas del anticuerpo. La invención se establece en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están abarcadas por las reivindicaciones adjuntas no se consideran como parte de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra una representación esquemática de una molécula de DVD-Ig.

15 Figuras 2 a 4 muestran varias representaciones de un formato de cadena ligera y pesada de acuerdo con la presente descripción.

Figura 5: muestra el análisis de SDS-PAGE de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds y DVD-Ig anti-A/anti-C purificadas mediante Proteína-G.

20 Figura 6: análisis de SDS-PAGE de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds y DVD-Ig anti-B/anti-C purificadas mediante Proteína-A.

Se proporcionan los dominios variables en cada cadena de manera que forman pares predefinidos con unión apropiada/adecuada al antígeno diana.

En una realización el par de dominio variable tiene afinidad por un antígeno diana de 100 nM o menos, como 50 nM o menos, en particular 1 nM o menos.

25 Los pares de dominios variables adecuados se pueden identificar mediante cualquier medio posible, por ejemplo, lo que incluye la generación de anticuerpos en huéspedes y la selección de células B. Alternativamente, se pueden identificar los pares adecuados mediante "phage display" (visualización de fagos).

30 Los componentes, como los dominios variables para usar en la presente invención, se pueden derivar de anticuerpos o fragmentos de estos. Los métodos descritos a continuación se pueden adaptar para preparar moléculas de la presente invención.

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

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

40 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de las especies no humanas y una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, US 5.585.089).

45 Los anticuerpos también se pueden generar usando diversos métodos de visualización de fagos conocidos en la técnica e incluyen aquellos descritos por Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 1995, 182, 41-50; Ames et al., J. Immunol. Methods, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24, 952-958; Persic et al., Gene, 1997, 187, 9-18; y Burton et al., Advances in Immunology, 1994, 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; y 5.969.108. Además, se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos, incluidos otros mamíferos, para generar anticuerpos humanizados.

50 Los anticuerpos completamente humanos son aquellos en los que las regiones variables y las regiones constantes (donde están presentes) tanto de la cadena pesada como de la ligera son todas de origen humano, o sustancialmente

idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante métodos de visualización de fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos en ratones en los que se han reemplazado los genes de la región constante y/o variable de la inmunoglobulina murina por sus homólogos humanos, p. ej., como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 B1, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP 0438474 B1 y EP 0463151 B1.

Se puede obtener un material de partida del fragmento Fab o Fab' a partir de cualquier anticuerpo completo, especialmente un anticuerpo monoclonal completo, usando cualquier técnica de escisión y/o digestión enzimática adecuada, por ejemplo, mediante tratamiento con pepsina. Alternativamente, o, además, se puede preparar el material de partida del anticuerpo mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y la re-expresión del ADN que codifica las regiones variables y/o constantes del anticuerpo. Se pueden usar técnicas de biología molecular estándar para modificar, añadir o eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Cualquier alteración en las regiones variables o constantes se abarcan aún por los términos regiones "variable" y "constante" como se usa en esta memoria.

Se puede obtener un fragmento de anticuerpo de cualquier especie que incluyen por ejemplo ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o humano. Se pueden obtener las partes del fragmento de anticuerpo a partir de más de una especie, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El fragmento de anticuerpo también se puede modificar. En otro ejemplo, se ha creado la región variable del fragmento de anticuerpo usando técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Dichas versiones de ingeniería incluyen aquellas creadas, por ejemplo, a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, supresiones o cambios en o de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Ejemplos particulares de este tipo incluyen aquellos dominios de región variable modificados por ingeniería genética que contienen al menos un CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos estructurales de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo. Son bien conocidos en la técnica los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos (véase, por ejemplo, Boss et al., US 4.816.397; Cabilly et al., US 6.331.415; Shrader et al., WO92/02551; Ward et al., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; Bird et al., 1988, Science, 242, 423; Queen et al., US 5.585.089; Adair, WO91/09967; Mountain and Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

En una realización cada par de dominios variables que forma un dominio de unión es un par semejante.

El par semejante, como se emplea en esta memoria, pretende referirse a un par natural de dominios variables, es decir, aislado de una célula que expresa un único anticuerpo o anticuerpos.

En un ejemplo, el par semejante es un par VH/VL complementario que se une al antígeno de manera cooperativa, es decir, es un par VH/VL complementario.

Típicamente el par semejante será un par VH/VL derivado del mismo anticuerpo.

En un ejemplo, el par semejante es un par de dominios variables aislados como un par a partir de una "biblioteca de pares", como un biblioteca de visualización de fagos Fab.

En un ejemplo el par VH/VL es monoespecífico.

Los dominios variables pueden haber sido optimizados y/o humanizados.

Los dominios variables optimizados/humanizados derivados de un par semejante aún se considerarán un par semejante después de la optimización/humanización.

A menos que el contexto indique lo contrario, se emplea la numeración Kabat en la lista a continuación. Siempre que se hace referencia a la numeración Kabat, la referencia relevante es Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., NIH, EE.UU.:

- 45 • VH37 + VL95C véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997);
- VH44 + VL100 véase por ejemplo Biochemistry 33, 5451-5459 Reiter et al. (1994); o Journal of Biological Chemistry Vol. 269, Nº 28, págs. 18327-18331 Reiter et al. (1994); o Protein Engineering, vol. 10, Nº 12, págs. 1453-1459 Rajagopal et al. (1997);
- VH44 + VL105 véase por ejemplo J. Biochem. 118, 825-831 Luo et al. (1995);
- 50 • VH45 + VL87 véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997);
- VH55 + VL101 véase por ejemplo FEBS Letters 377, 135-139 Young et al. (1995);
- VH100 + VL50 véase por ejemplo Biochemistry 29, 1362-1367 Glockshuber et al. (1990);

- VH100b + VL49
- VH98 + VL46 véase por ejemplo Protein Science 6, 781-788 Zhu et al. (1997);
- VH101 + VL46
- VH105 + VL43 véase por ejemplo Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90, págs. 7538-7542 Brinkmann et al. (1993); o Proteins 19, 35-47 Jung et al., (1994), o
- VH106 + VL57 véase por FEBS Letters 377, 135-139 Young et al. (1995)

o una posición correspondiente al mismo en el par de regiones variables ubicadas en la molécula.

Los pares de aminoácidos anteriormente enumerados están en las posiciones conducentes a la sustitución por cisteínas de tal manera que pueden formarse enlaces disulfuro. Se pueden diseñar las cisteínas en estas posiciones deseadas mediante técnicas conocidas. En una realización, por lo tanto, una cisteína diseñada de acuerdo con la presente invención se refiere al lugar donde se ha reemplazado el residuo natural en una posición de aminoácido dada con un residuo de cisteína.

Se puede realizar la introducción de cisteínas diseñadas mediante ingeniería genética usando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis por extensión por PCR solapada, mutagénesis dirigida o mutagénesis de casete (véase, en general, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Están comercialmente disponibles kits de mutagénesis dirigida, p. ej., QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagen, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete se puede realizar según Wells et al., 1985, Gene, 34: 315-323. Alternativamente, se pueden fabricar mutantes mediante síntesis génica total por anillamiento, ligación y amplificación por PCR y clonaje de los nucleótidos solapantes.

Un par de dominio variable (VH/VL) de la presente invención puede estar unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas, una en VH y otra en VL, en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

Un par de dominio variable (VH/VL) de la presente invención puede estar unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas, uno en VH y otro en VL, que están fuera de las CDRs en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

Un par de dominio variable (VH/VL) de la presente invención puede estar unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas, uno en VH y otro en VL, que están fuera de las CDRs en donde la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

Un par de dominio variable (VH/VL) de la presente invención puede estar unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas en donde el residuo de cisteína de VH está en la posición 44 y el residuo de cisteína de VL está en la posición 100.

Un par de dominio variable (VH/VL) puede estar unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas diseñados por ingeniería genética, uno en VH y otro en VL, en donde la posición del par de residuos de cisteína diseñados por ingeniería genética se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH100b y VL49, VH98 y VL46, VH101 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

El par de dominio variable (VH/VL) de la presente invención puede estar unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas diseñados por ingeniería genética, uno en VH y otro en VL, que están fuera de las CDRs en donde la posición del par de residuos de cisteína diseñados por ingeniería genética se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL100, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

El par de dominio variable (VH/VL), por ejemplo, está unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas diseñados por ingeniería genética, uno en VH y otro en VL, que están fuera de las CDRs en donde la posición del par de residuos de cisteína diseñados por ingeniería genética se selecciona del grupo que consiste en VH37 y VL95, VH44 y VL105, VH45 y VL87, VH100 y VL50, VH98 y VL46, VH105 y VL43 y VH106 y VL57.

El par de dominio variable (VH/VL), por ejemplo, está unido mediante un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas diseñados por ingeniería genética en donde el residuo de cisteína diseñado por ingeniería genética de VH está en la posición 44 y el residuo de cisteína diseñado por ingeniería genética de VL está en la posición 100.

- En una realización existe un enlace disulfuro entre  $VH_1$  y  $VL_1$  solamente.
- En una realización existe un enlace disulfuro entre  $VH_1$  y  $VL_1$  y también un enlace disulfuro entre  $VH_2$  y  $VL_2$ .
- En una realización la proteína de unión se une con afección al antígeno diana.
- 5 En una realización la proteína de unión de acuerdo con la presente descripción es monoespecífica. Monoespecífico como se emplea en esta memoria pretende referirse al hecho de que todos los sitios de unión se unen al mismo antígeno diana. En un aspecto de esta realización, todos los sitios de unión se unen al(los) mismo(s) epítipo(s) de dicho antígeno. En una realización alternativa, al menos dos sitios de unión se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana.
- 10 En una realización, la proteína de unión de acuerdo con la presente descripción es biespecífica de manera que se unen específicamente dos sitios de unión a antígenos diferentes o distintos.
- Se une específicamente como se emplea en esta memoria pretende referirse a que los anticuerpos tienen una alta afinidad por un antígeno diana (al que es específico) y que se unen a antígenos a los que no son específicos con una afinidad baja o mucho menor (o nada en absoluto). Los expertos en la técnica conocen métodos para medir la afinidad e incluyen ensayos como el BIAcore.
- 15 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una alta afinidad de unión, en particular, nanomolar o picomolar. La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo BIAcore. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 30 pM o mejor. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención es completamente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor.
- 20
- 25 "C" como se emplea en esta memoria se refiere a la porción de región constante de la cadena ligera que puede ser una región constante natural (dominio constante), por ejemplo, una región constante natural derivada de una cadena ligera, p. ej., kappa o lambda.
- Dominio constante como se emplea en esta memoria pretende referirse a  $CH_1$ ,  $CH_2$ ,  $CH_3$  o a un dominio constante de una cadena ligera.
- En una realización CH es un dominio  $CH_1$ .
- 30 En una realización C es un dominio constante de una cadena ligera, es decir, CL.
- Fc como se emplea en esta memoria es una región que comprende un dominio constante.
- En una realización la región Fc comprende los dominios  $-CH_2CH_3$ .
- En una realización y es 1.
- En una realización n es 1.
- 35 En una realización n es 0.
- En una realización, está presente un enlace disulfuro "natural" entre un  $CH_1$  y CL. El dominio CL se deriva de Kappa o de Lambda. La posición natural para una cisteína que forma enlace en este último es la 214 en cKappa y cLambda humanas (numeración de Kabat 4ª edición 1987). Se conoce la posición de la cisteína que forma el enlace para los otros isotipos humanos como gamma 2, 3, 4, IgM e IgD, por ejemplo, la 127.
- 40 La localización exacta de la cisteína que forma el enlace disulfuro en  $CH_1$  depende del dominio particular realmente empleado. Así, por ejemplo, en gamma-1 humana, la posición natural del enlace disulfuro se localiza en la posición 233 (numeración de Kabat 4ª edición 1987). Se conoce la posición de la cisteína que forma el enlace para los otros isotipos humanos como gamma 2, 3, 4, IgM e IgD, por ejemplo, la 127.
- 45 En una realización, la proteína de unión, de acuerdo con la descripción, tiene un enlace disulfuro en una posición equivalente o correspondiente a la de los CH y C naturales como CL.
- En una realización, una región constante que comprende CH y una región constante como CL tiene un enlace disulfuro que está en una posición no natural. Esto se puede diseñar por ingeniería dentro de la molécula introduciendo cisteína(s) dentro de la cadena de aminoácidos en la posición requerida. Este enlace disulfuro no natural es adicional o como alternativa al enlace disulfuro natural presente entre CH y CL.

En una realización no está presente el enlace disulfuro entre CH y CL, por ejemplo, se pueden reemplazar las cisteínas intercatenarias por otros aminoácidos, como serina.

En una o más realizaciones en esta memoria no hay enlaces disulfuro intercatenarios en las regiones constantes y/o Fc, por ejemplo, la región bisagra de esta.

- 5 Alternativamente, se pueden proporcionar una o más realizaciones en esta memoria con uno o más (como dos) enlaces disulfuro en las regiones constante y/o Fc, como la región bisagra de esta.

Un(os) enlace(s) disulfuro en la región Fc puede(n), por ejemplo, estar en un área aproximadamente correspondiente a la región bisagra en anticuerpos naturales.

Se pueden emplear regiones Fc modificadas, por ejemplo, como se describe en el documento WO2008/131242.

- 10 En una realización, el fragmento CH en la cadena pesada comprende un dominio CH<sub>1</sub>. Es decir, un dominio de origen natural 1 de una cadena pesada o un derivado de esta. En una realización el fragmento CH consiste en un dominio CH<sub>1</sub>.

En una realización, el fragmento CL en la cadena ligera comprende una secuencia kappa constante o una secuencia lambda constante.

- 15 Un derivado de un dominio de origen natural como se emplea en esta memoria pretende referirse a donde se han reemplazado o eliminado uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia de origen natural, por ejemplo, para optimizar las propiedades del dominio, por ejemplo, eliminando propiedades no deseadas, pero en donde se conservan las características que caracterizan el dominio.

- 20 En una realización, la región Fc comprende los dominios CH<sub>2</sub> y/o CH<sub>3</sub>. En una realización, el fragmento Fc del extremo N-terminal es -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. En una realización alternativa, la región Fc comprende o consiste en el extremo N-terminal -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. A este último se le puede proporcionar un enlazador entre el medio de CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> (como -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>enlazadorCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) para permitir la flexibilidad del extremo CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> terminal que se alinee con el primer CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (que está unido al extremo C terminal del resto de la molécula). Esta disposición del Fc puede prolongar la vida media y/o permitir que la flexibilidad controle/proporcione fragmentos de anticuerpos que no se entrecrucen, si se desea.

Ya se han descrito varias regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en US5.677.425, US6642356, WO9915549, WO2005003170, WO2005003169, WO2005003170, WO9825971 y WO2005003171. La bisagra generalmente está ubicada (a partir del extremo N terminal) entre el primer y el segundo dominio constante en la cadena pesada. Ejemplos particulares de bisagras incluyen los que se muestran en la Tabla 1.

- 30 **Tabla 1. Secuencias enlazadoras de la bisagra**

SEQ ID N°:	SECUENCIA
1	DKTHTCAA
2	DKTHTCPPCPA
3	DKTHTCPPCPATCPPCPA
4	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
5	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
6	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
7	DKTHTCCVECPCPA
8	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPCPRCPA
9	DKTHTCPSCPA

Así, en una realización, la cadena pesada y/o ligera comprende una bisagra modificada.

Las bisagras modificadas descritas anteriormente en la Tabla 1 también se pueden usar como enlazadores en otras partes de las moléculas, según se requiera.

- 35 Se cree que la disposición de C en la cadena ligera y CH<sub>1</sub>, el fragmento de la región constante en la cadena pesada es la de minimizar la dimerización inapropiada.

Los inventores creen que proporcionando dominios variables como pares semejantes en el constructo final optimiza y

## ES 2 717 883 T3

mantiene las propiedades de unión al antígeno deseables del sitio de unión formado por el par relevante.

Ejemplos de enlazadores peptídicos adecuados se dan a continuación, por ejemplo en la Tabla 2.

Enlazadores adecuados para X<sub>1</sub> incluyen:

Tabla 2. Secuencias enlazadoras flexibles

SEQ ID N°:	SECUENCIA
10	SGGGGSE
11	DKTHTS
12	(S)GGGGS
13	(S)GGGGSGGGGS
14	(S)GGGGSGGGGSGGGGS
15	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
16	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
17	AAAGSG-GASAS
18	AAAGSG-XGGGS-GASAS
19	AAAGSG-XGGGSXGGGS-GASAS
20	AAAGSG-XGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
21	AAAGSG-XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
22	AAAGSG-XS-GASAS
23	PGNRRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
24	ATTTGSSPGPT
25	ATTTGS
	GS
26	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
27	GTVAAPSVFIFPPSD
28	GGGGIAPSMVGGGGS
29	GGGGKVEGAGGGGGS
30	GGGGSMKSHDGGGGS
31	GGGGNLITIVGGGGS
32	GGGGVPSLPGGGGS
33	GGEKSIPGGGGS
34	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
35	YPRSIYIRRRHPSPLTT
36	TPSHLSHILPSFGLPTFN
37	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
38	SPAAHFPRSIPRPGPIRT

ES 2 717 883 T3

39	APGPSAPSHRSLPSRAFG
40	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
41	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
42	SPQYPSPLTLTPPHPSL
43	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
44	LPWRTSLLPSLPLRRRP
45	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
46	VPPAPVVSLRSAHARPPY
47	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
48	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
49	CNPLLPLCARSPAVRTFP
(S) es opcional en las secuencias 13 a 16.	

Ejemplos de enlazadores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEQ ID N°: 94), PPPP (SEQ ID N°: 95) y PPP.

En una realización  $X_1$  se selecciona de:

SEQ ID N°:	SECUENCIA
50	AKTTPKLEEGEFSEAR
51	AKTTPKLEEGEFSEARV
52	AKTTPKLGG
53	SAKTTPKLGG
54	AKTTPKLEEGEFSEARV
55	SAKTTP
56	SAKTTPKLGG
57	RADAAP
58	RADAAPTVS
59	RADAAAAGGPGS
60	RADAAAA(G <sub>4</sub> S) <sub>4</sub>
61	SAKTTPKLEEGEFSEARV
62	ADAAP
63	ADAAPTVSIFPP
64	TVAAP
65	TVAAPSVFIFPP
66	QPKAAP
67	QPKAAPSVTLFPP
68	AKTTPP

69	AKTTPPSVTPLAP
70	AKTTAP
71	AKTTAPSVYPLAP
72	ASTKGP
73	ASTKGPSVFPLAP
74	GENKVEYAPALMALS
75	GPAKELPLKEAKVS
76	GHEAAAVMQVQYPAS
77	SAKTPP
78	TVSSASTKGP
79	EIKRTTVAAPS
96	EIKRTVAAPS
97	RTVAAP

En una realización, X<sub>1</sub> es un péptido enlazador que es un péptido que une albúmina.

Se proporcionan ejemplos de péptidos que unen albúmina en el documento WO2007/106120 e incluyen:

Tabla 3

SEQ ID N°:	SECUENCIA
80	DLCLRDWGCLW
81	DICLPRWGCLW
82	MEDICLPRWGCLWGD
83	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
84	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
85	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
86	EDICLPRWGCLWEDD
87	RLMEDICLPRWGCLWEDD
88	MEDICLPRWGCLWEDD
89	MEDICLPRWGCLWED
90	RLMEDICLARWGCLWEDD
91	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
92	RAPESFVCYWETICFERSEQ
93	EMCYFPGICWM

5

X<sub>1</sub> en la cadena pesada y ligera se puede seleccionar independientemente. Sin embargo, en una realización, X<sub>1</sub> en la cadena pesada y en la cadena ligera son idénticos.

Se apreciará que se pueden realizar una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos en los dominios variables del anticuerpo, proporcionados por la presente descripción sin alterar significativamente la

capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno diana y neutralizar su actividad. El efecto de cualquier sustitución, adición y/o eliminación de aminoácidos se puede probar fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, usando los ensayos *in vitro*, por ejemplo, un ensayo BIAcore.

5 Se pueden seleccionar los dominios de las regiones constantes y de las regiones Fc de la proteína de unión de la presente invención teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, en particular las funciones efectoras que pueden ser necesarias y, por ejemplo, pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se puede usar IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la proteína de unión está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de los anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 se pueden usar cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de los anticuerpos. Se apreciará que también se pueden usar variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, se pueden usar moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado por prolina como se describe en Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30(1), 105-108. Un experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos pueden sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones dependen a menudo de la línea de células huésped usada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones del cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995).

20 En una realización, la descripción proporciona un par de proteínas de unión. Un par de proteínas de unión se pueden denominar en esta memoria como un anticuerpo.

Si se desea, se puede conjugar un anticuerpo para usar en la presente invención con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora pueda comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas unidas de manera que formen un único resto que se pueda unir a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, esto se puede preparar por procedimientos de ADN químicos o recombinantes estándar en los que se une el fragmento de anticuerpo, ya sea directamente o a través de un agente de acoplamiento, a la molécula efectora. Son bien conocidas en la técnica las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpos (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, se puede lograr el enlace usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en los documentos WO86/01533 y EP0392745.

35 El término molécula efectora como se usa en esta memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de estos p. ej., ADN, ARN y fragmentos de estos, radionúclidos, en particular radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar mediante espectroscopía de RMN o ESR.

40 Ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citoquinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej., que destruya) células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemisterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tatracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de estos.

45 Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluoracil decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, clorambucilo tioepa, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados como <sup>111</sup>In y <sup>90</sup>Y, Lu<sup>177</sup>, Bismuto<sup>213</sup>, California<sup>252</sup>, Iridio<sup>192</sup> y Tungsteno<sup>188</sup>/Renio<sup>188</sup>; o fármacos como, pero no se limitan a, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

55 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de difteria, una proteína como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica como una

linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales que emiten positrones (para usar en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la Patente de EE.UU. N° 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para usar como diagnóstico. Enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina y núclidos radiactivos adecuados incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In y <sup>99</sup>Tc.

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la distribución de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas que unen albúmina o compuestos que unen albúmina como los descritos en el documento WO 05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero, en general puede ser un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo, un polialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, polímero de polialquileno o de polioxilquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej., un homo- o hetero-polisacárido.

Sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(vinilalcohol) o derivados de estos de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de este.

Polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de estos.

“Derivados” como se usa en esta memoria pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos para tiol como maleimidias y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el residuo de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto como el grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

Se puede variar el tamaño del polímero según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50.000 Da, por ejemplo, de 5.000 a 40.000 Da, como de 20.000 a 40.000 Da. Se puede seleccionar el tamaño del polímero en particular en función del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizarse en ciertos tejidos como tumores o de prolongar la vida media circulante (para revisión véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto salga de la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5.000 Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo, que tenga un peso molecular en el intervalo de 20.000 Da a 40.000 Da.

Polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de este y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15.000 Da a aproximadamente 40.000 Da.

En un ejemplo, los anticuerpos están unidos a los restos de poli(etilenglicol) (PEG) y las moléculas de PEG se pueden unir a través de cualquier grupo funcional de aminoácidos de cadena lateral o terminales disponible ubicados en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden aparecer en el anticuerpo de forma natural o pueden modificarse en el fragmento mediante ingeniería genética usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo US 5.219.996; US 5.667.425; WO 98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención comprende un extremo C-terminal modificado en donde la modificación es la adición de uno o más aminoácidos al extremo C-terminal de su cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora. Alternativa o adicionalmente, se pueden añadir o insertar aminoácidos en la bisagra para formar una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

En una realización, se une una molécula de PEG a una cisteína 171 en la cadena ligera, por ejemplo, véase el documento WO 2008/038024.

De forma adecuada, las moléculas de PEG están unidas a través de grupos tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida a la porción modificada del anticuerpo se

puede unir covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Donde se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras activadas de manera apropiada, por ejemplo, derivados selectivos de tiol como maleimidas y derivados de cisteína. Se puede usar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímero como se describe anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contiene un grupo reactivo de tiol, como un ácido o éster  $\alpha$ -halocarboxílico, p. ej., yodoacetamida, una imida, p. ej., maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o se pueden preparar a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y de SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

La presente descripción también proporciona ADN aislado que codifica una proteína de unión descrita en esta memoria o un fragmento de esta de una cadena pesada o ligera de esta.

En un aspecto adicional, se proporciona un vector que comprende dicho ADN.

Son bien conocidos por los expertos en la técnica los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, New York y el Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbour Publishing.

En un aspecto adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho vector y/o ADN.

Se puede usar cualquier sistema de célula huésped/vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli* y otros sistemas microbianos o también se pueden usar sistemas eucarióticos de expresión en célula huésped, por ejemplo, de mamífero. Células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una proteína de unión de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector (y/o ADN) de la presente invención en condiciones adecuadas para dar lugar a la expresión de proteína a partir del ADN que codifica la proteína de unión de la presente invención y aislar la proteína de unión.

La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solamente se necesita usar la secuencia codificadora de un polipéptido de la cadena pesada o ligera para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprenden tanto la cadena pesada como la ligera, se puede transfectar la línea celular con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de la cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de la cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un único vector, el vector que incluye secuencias que codifican los polipéptidos de la cadena ligera y de la cadena pesada.

La proteína de unión y los fragmentos de acuerdo con la presente descripción se expresan a niveles adecuados a partir de las células huésped. Por lo tanto, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos pueden ser propicias para el procesamiento comercial.

La proteína de unión de la presente descripción es útil en el tratamiento y/o profilaxis de una afección patológica.

Por lo tanto, se proporciona una proteína de unión para usar en el tratamiento, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de esta. En una realización el anticuerpo o componente de cadena única de este se administra en una formulación farmacéutica.

La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una proteína de unión de la presente invención en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o transportadores farmacéuticamente aceptables. Por consiguiente, se proporciona el uso de una proteína de unión para la fabricación de un medicamento. La composición normalmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un transportador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede adicionalmente comprender un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la proteína de unión de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar acompañado por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 $\beta$ , anti-célula T, anti-IFN $\gamma$  o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

- 5 En una realización adicional el anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la descripción se emplea en combinación con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo, un corticoesteroide (como propionato de fluticasona) y/o un beta-2-agonista (como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y de la proliferación celular (como rapamicina, ciclofosfamida, metotrexato) o un inhibidor de CD28 y/o CD40 alternativo. En una realización, el inhibidor es una molécula pequeña. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico de la diana.
- 10 La composición farmacéutica comprende adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión de la invención. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en esta memoria se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección objetivo o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. La cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. Se puede también usar el modelo animal para determinar el intervalo de concentración apropiado y la ruta de administración. Se puede usar dicha información para determinar dosis útiles y rutas para la administración en seres humanos.
- 15 La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de la administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante experimentación de rutina y queda dentro del juicio del clínico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosificación unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.
- 20 Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación (p. ej., simultánea, secuencial o separadamente) con otros agentes, fármacos u hormonas.
- 25 La dosis a la que se administra una proteína de unión de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está usando de manera profiláctica o para tratar una afección existente.
- 30 La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media de la proteína de unión y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una corta vida media (p. ej., de 2 a 10 horas) sería necesario dar una o más dosis por día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una larga vida media (p. ej., de 2 a 15 días), sería solamente necesario dar una dosis una vez al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.
- 35 El transportador farmacéuticamente aceptable no debería inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Transportadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.
- 40 Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos o sales de ácidos orgánicos, como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.
- 45 Transportadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden adicionalmente contener líquidos como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en dichas composiciones sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras del pH. Dichos transportadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como pastillas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, soluciones en suspensión y suspensiones, para la ingestión por el paciente.
- Formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, p. ej., mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes.
- 50 Alternativamente, la proteína de unión puede estar en forma seca, para reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.
- Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones se adaptan las composiciones para la administración a sujetos humanos.
- 55 De manera adecuada, en formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoelectrico de la proteína de unión o fragmento, por ejemplo, si el pH de la formulación es 7 entonces puede ser apropiado un  $pI$  de 8-9 o superior. Sin ánimo de ceñirse a ninguna teoría, se cree que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo, la proteína de unión o fragmento de esta se mantiene en solución.

- Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por cualquier número de rutas que incluyen, pero no se limitan a, rutas oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Se pueden usar también hidro-esprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o como suspensiones líquidas. Se pueden también preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.
- La distribución directa de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se distribuirá al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones se pueden también administrar dentro de la lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiple.
- Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición es para ser administrada mediante una ruta que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan a la proteína de unión de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido del tracto gastrointestinal.
- Está disponible una discusión completa de transportadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).
- En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas que incluyen la inhalación.
- Preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles de medición que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas mencionadas anteriormente o en una mezcla de las sustancias activas mencionadas anteriormente con excipiente fisiológicamente aceptable.
- Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (p. ej., glucosa o arabinosa), disacáridos (p. ej., lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (p. ej., dextranos), polialcoholes (p. ej., sorbitol, manitol, xilitol), sales (p. ej., cloruro sódico, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se usan de manera adecuada los mono- y disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.
- Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 10 micras, como 1-9 micras por ejemplo de 0,1 a 5  $\mu\text{m}$ , en particular de 1 a 5  $\mu\text{m}$ . Es de primaria importancia el tamaño de partícula del ingrediente activo (como la proteína de unión o el fragmento).
- Se conocen en la técnica los gases propelentes que se pueden usar para preparar los aerosoles inhalables. Los gases propelentes adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes anteriormente mencionados se pueden usar solos o en mezclas de los estos.
- Gases propelentes particularmente adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG 227. De los hidrocarburos halogenados anteriormente mencionados, son particularmente adecuados TG 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG 227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de estos.
- Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes como codisolventes, estabilizadores, agentes tensioactivos (surfactantes), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes se conocen en la técnica.
- Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente de acuerdo con la invención pueden contener hasta el 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de 0,002 a 5% en peso, de 0,01 a 3% en peso, de 0,015 a 2% en peso, de 0,1 a 2% en peso, de 0,5 a 2% en peso o de 0,5 a 1% en peso de ingrediente activo.
- Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante administración de una formulación en solución líquida o en suspensión, por ejemplo, empleando un dispositivo como un nebulizador conectado a un compresor (p. ej., el nebulizador Pari LC-Jet Plus (R) conectado a un compresor Pari Master (R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).
- El anticuerpo de la invención se puede distribuir dispersado en un disolvente, p. ej., en forma de una solución o de una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, p. ej., solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tampón. Las soluciones tampón conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato sódico por 1 ml de agua para lograr un pH aproximadamente de 4,0 a 5,0. Se puede preparar una suspensión o solución a partir de, por ejemplo, un anticuerpo liofilizado.

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

Esto puede incluir la producción y la esterilización mediante filtración del disolvente/solución tamponado usado para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución disolvente tamponada estéril y la dispensación de la formulación dentro de recipientes estériles por métodos familiares a los expertos en la técnica.

Se puede proporcionar la formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, como unidades de dosis única (p. ej., contenedores o viales de plástico sellados) empaquetados, en particular, en sobres de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis única en un volumen, p. ej., de 2 ml, de disolvente/solución tampón.

La proteína de unión de la presente descripción se cree que es adecuada para la distribución a través de nebulización.

Comprender en el contexto de la presente especificación tiene el propósito de incluir el significado.

donde se puedan combinar realizaciones técnicamente apropiadas de la invención.

Se describen en esta memoria las realizaciones como que comprenden ciertas características/elementos. La descripción La descripción también se extiende a realizaciones separadas que consisten o que consisten esencialmente en dichas características/elementos.

#### Descripción de las figuras

- Figura 1 muestra una representación esquemática de una molécula de DVD-Ig.
- Figura 2 a 4 muestran varias representaciones de un formato de cadena ligera y pesada de acuerdo con la presente descripción.
- Figura 5 muestra el análisis de SDS-PAGE de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds y DVD-Ig y anti-A/anti-C purificadas por Proteína-G.
- Figura 6 análisis de SDS-PAGE de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds y DVD-Ig anti-B/anti-C purificadas por Proteína-A.

#### Ejemplo 1

Generación y análisis de un DVD-Ig anti-A/anti-C estabilizado con disulfuro

Construcción de plásmidos de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds (anti-A exterior, anti-C interior) y DVD-Ig anti-A/anti-C (anti-A exterior, anti-C interior)

La región variable de la cadena ligera total que consiste en anti-A variable –enlazador (RTVAAP (SEQ ID N°: 97))-anti-C variable se compró en DNA2.0 y se clonó como un fragmento HindIII/BsiW1 dentro del vector UCB de cadena ligera kappa humana de expresión en mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E. La región variable de la cadena pesada total que consiste en anti-A variable –enlazador (ASTKGP (SEQ ID N°: 72))-anti-C variable se compró en DNA2.0 y se clonó como un fragmento HindIII/Xho1 dentro del vector UCB de cadena pesada IgG1 humana de expresión en mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E. Se logró la estabilización por disulfuro de la región variable (anti-A) exterior mediante mutación de la cisteína en la posición 44 de la cadena pesada y la 100 de la cadena ligera usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange Lightening Site de Agilent Technologies siguiendo el protocolo del fabricante. Se diseñaron dos parejas de oligos de 30 pares de bases para introducir la mutación de cisteína en las posiciones de aminoácidos 44 de la pesada y en la 100 de la ligera. Los constructos estabilizados por disulfuro se verificaron mediante secuenciación.

Expresión en mamífero de DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds

Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de la cadena pesada y ligera usando el reactivo de transfección 293fectina de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 24 µg de plásmido de cadena pesada y 24 µg de plásmido de cadena ligera con 120 µl de 293fectina y 4080 µl de medio OptiMEM durante 20 minutos a TA. La mezcla se añadió después a 60x10<sup>6</sup> células HEK293 en 60 ml de suspensión y se incubaron durante 7 días con agitación a 37°C. Después de 7 días se recogió el sobrenadante por centrifugación a 1500xg para eliminar las células y después se filtró por 0,22 µm en estéril.

Cuantificación por Proteína-G de DVD-Ig anti-A/anti-C y de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds

Se ensayó el nivel de expresión en los sobrenadantes de mamífero por un método de Proteína-G por HPLC. Se

llevaron a cabo múltiples ciclos de purificación por Proteína-G en cantidades conocidas de anticuerpo estándar y cantidades desconocidas de muestras. Se midió el área del pico de elución seguido por la absorbancia a 280 nm y se creó una curva estándar de cantidades conocidas de anticuerpo frente al área del pico de elución. Se usó la curva estándar para convertir las áreas del pico de elución de la muestra a cantidades de anticuerpo con el ajuste de los diferentes coeficientes de extinción. La purificación por Proteína-G consistió en muestras aplicadas a 1 ml/min a una columna de 1 ml de Gammabind Plus Sepharosa (GE Healthcare) equilibrada en fosfato sódico 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4. La columna se lavó con fosfato sódico 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4 y el material unido se eluyó con glicina/HCl 50 mM pH 2,7. El nivel de expresión de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds y de DVD-Ig anti-A/anti-C se muestran en la Tabla 4. La introducción de la estabilización por disulfuro de la región variable anti-A (región v exterior) tuvo un efecto mínimo en el nivel de expresión.

Tabla 4

Nivel de expresión de DVD-Ig anti-A/anti-C y de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds	
	Nivel de expresión (µg/ml)
DVD-Ig anti-A/anti-C	7,2
DVD-Ig anti-A/anti-C + ds	10,1

#### Purificación por Proteína-G de DVD-Ig anti-A/anti-C y de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds

Los sobrenadantes de ~50 ml filtrados por 0,22 µm se concentraron hasta ~2 ml usando concentradores Amicon Ultra-15 con un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante. Se aplicaron 1,8 ml de sobrenadante concentrado a 1 ml/min a una columna de 1 ml de Gammabind Plus Sepharosa (GE Healthcare) equilibrada en fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 y el material unido se eluyó con glicina/HCl 0,1 M pH 2,7. El pico de elución se recogió y se ajustó el pH a ~pH 7 con Tris/HCl 2 M pH 8,8. La elución de pH ajustado se concentró y se diafiltró en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 usando concentradores Amicon Ultra-15 con un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante.

#### Análisis de SDS-PAGE de DVD-Ig anti-A/anti-C y de DVD-Ig anti-A/anti-C + ds purificados por Proteína-G

A 26 µl de muestra purificada por Proteína-G a ~0,1 mg/ml en PBS se añadieron 10 µl de tampón de electroforesis de muestra LDS 4X (Invitrogen). Para muestras no reducidas, se añadieron 4 µl de NEM 100 mM y para muestras reducidas se añadieron 4 µl de agente reductor 10X (Invitrogen). Las muestras se agitaron mediante vortex, se incubaron a 100°C durante 3 min, se enfriaron y se centrifugaron a 12.500 rpm durante 30 segs. Las muestras preparadas se cargaron, 30 µl/~1,9 µg, en un gel de SDS Tris/Glicina acrilamida 4-20% y se corrió durante 110 min. a 125V. Los geles se tiñeron para tinción de proteínas con Azul de Coomassie y se destiñeron con ácido acético al 7,5%, véase la Figura 5. En condiciones reductoras, tanto DVD-Ig anti-A/anti-C como DVD-Ig anti-A/anti-C + ds corrieron como 2 bandas principales en las mismas posiciones, una a ~65 kDa y otra a ~40 kDa. La banda de ~65 kDa corresponde a la cadena pesada y la banda de ~40 kDa a la cadena ligera. También hay bandas menores ligeramente más intensas en DVD-Ig anti-A/anti-C en comparación con DVD-Ig anti-A/anti-C + ds lo que sugiere que hay un poco más de ruptura del DVD-Ig cuando el disulfuro estabilizador está ausente. En condiciones no reductoras, la banda principal tanto para DVD-Ig anti-A/anti-C como para DVD-Ig anti-A/anti-C + ds está a ~250 kDa, sin embargo, la banda principal para DVD-Ig anti-A/anti-C + ds es ligeramente más baja que la banda principal para DVD-Ig anti-A/anti-C. Este tamaño aparente ligeramente más pequeño del DVD-Ig estabilizado con disulfuro es indicativo de la formación del enlace de disulfuro estabilizador. De nuevo, también hay bandas menores ligeramente más intensas en DVD-Ig anti-A/anti-C en comparación con DVD-Ig anti-A/anti-C + ds, lo que sugiere que hay un poco más de ruptura del DVD-Ig cuando el disulfuro estabilizador está ausente.

#### Análisis de exclusión por tamaño de DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds purificados por Proteína-G

Se analizaron muestras purificadas por Proteína-G mediante HPLC de exclusión por tamaño. Las muestras se separaron en una columna Superdex 200 10/300 GL Tricorn (GE Healthcare) desarrollada con un gradiente isocrático de PBS pH 7,4 a 1 ml/min. La detección de picos fue a 280 nm y se calculó el peso molecular aparente por comparación con una curva estándar de proteínas de peso molecular conocido frente al volumen de elución. La introducción de la estabilización con disulfuro de la región variable anti-A (región v exterior) tiene un efecto mínimo en el tamaño aparente del DVD-Ig (225 kDa (DVD-Ig) frente a 227 kDa (DVD-Ig + ds) pero aumentó el porcentaje de monómero en un 10%. El aumento en el monómero se debió a una disminución tanto en especies de alto peso molecular como en especies de bajo peso molecular.

#### Purificación por exclusión por tamaño de DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds purificados por Proteína-G

100 µl del eluido de Proteína-G concentrado y diafiltrado se aplicaron a una columna Superdex 200 10/300GL Tricorn

(GE Healthcare) equilibrada en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4. La columna se desarrolló con un gradiente isocrático de fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 a 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y la fracción que contenía el vértice del pico del monómero se conservó para el análisis.

Análisis de afinidad BIAcore de DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds purificados por exclusión por tamaño

5 Se determinaron las afinidades de unión y los parámetros cinéticos para la interacción del monómero DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds purificados por exclusión por tamaño con el antígeno C, A1 y A2 mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) realizada en un BIAcore T200 CM5 que usa chips de sensores y tampón de migración HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), Na Cl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,5% v/v). Las muestras de DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds se capturaron en la superficie del chip sensor usando un anticuerpo monoclonal anti-CH1 humano generado en la empresa. La inmovilización covalente del anticuerpo de captura se logró mediante química estándar de acoplamiento de amina. Cada ciclo de ensayo consistió en capturar primero el DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds usando una inyección de 1 min, antes de una fase de asociación que consiste en una inyección de antígeno de 3 min, después de la que se monitorizó la disociación durante 20 min. Después de cada ciclo, se regeneró la superficie de captura con 2 inyecciones x 1 min de HCl 40 mM seguidas de 30 s de NaOH 5 mM. Los caudales usados fueron 10 µl /min para la captura, 30 µl /min para las fases de asociación y de disociación y 10 µl /min para la regeneración. Se realizaron titulaciones (de 1,1 nM a 30 mM) para cada antígeno, C, A1 y A2, se usó una celda de flujo en blanco para la sustracción de la referencia y se incluyeron inyecciones en blanco de tampón para sustraer el ruido y la deriva del instrumento. Se determinaron los parámetros cinéticos mediante el ajuste global simultáneo de los sensorgramas resultantes a un modelo estándar de unión 1:1 usando el software de Evaluación Biacore T200 v1.0. La introducción de la estabilización con disulfuro de la región variable anti-A (región v exterior) tuvo un efecto mínimo en las afinidades y estequiometrías de la unión del antígeno tanto para las regiones variables anti-A (exterior) como anti-C (interior) frente a todos los antígenos analizados, véase Tabla 5.

**Tabla 5**

<b>Análisis de afinidad BIAcore de DVD-Ig anti-A/anti-C y DVD-Ig anti-A/anti-C + ds purificados por exclusión por tamaño</b>						
	Antígeno C		Antígeno A1		Antígeno A2	
	KD (pM)	Estequiometría	KD (pM)	Estequiometría	KD (pM)	Estequiometría
DVD-Ig anti-A/anti-C + ds	813	0,54	4,10	1,06	15,2	1,10
DVD-Ig anti-A/anti-C	517	0,69	2,69	0,77	10,3	0,77

**25 Ejemplo 2**

Generación y análisis de DVD-Ig anti-B/anti-C estabilizado con disulfuro

Construcción de plásmidos de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds (anti-B exterior, anti-C interior) y DVD-Ig anti-B/anti-C (anti-A exterior, anti-C interior)

30 La región variable de la cadena ligera total que consiste en anti-B variable –enlazador (RTVAAP (SEQ ID N°: 97))-anti-C variable se compró en DNA2.0 y se clonó como un fragmento HindIII/BsiW1 dentro del vector UCB de cadena ligera kappa humana de expresión en mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E. La región variable de la cadena pesada total que consiste en anti-B variable –enlazador (ASTKGP (SEQ ID N°: 72))-anti-C variable se compró en DNA2.0 y se clonó como un fragmento HindIII/Xho1 dentro del vector UCB de cadena pesada IgG1 humana de expresión en mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia poliA de SV40E. Se logró la estabilización por disulfuro de la región variable (anti-B) exterior mediante mutación de la cisteína en la posición 44 de la cadena pesada y la 100 de la cadena ligera usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange Lightning Site de Agilent Technologies siguiendo el protocolo del fabricante. Se diseñaron dos parejas de oligos de 30 pares de bases para introducir la mutación de cisteína en las posiciones de aminoácidos 44 de la pesada y en la 100 de la ligera. Los constructos estabilizados por disulfuro se verificaron mediante secuenciación.

40 Expresión en mamíferos de DVD-Ig anti-B/anti-C y de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds

45 Las células HEK293 se transfectaron con los plásmidos de cadena pesada y ligera usando el reactivo de transfección 293fectina de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 24 µg de plásmido de cadena pesada y 24 µg de plásmido de cadena ligera con 120 µl de 293fectina y 4080 µl de medio Optimem durante 20 minutos a TA. La mezcla se añadió después a 60x10<sup>6</sup> células HEK293 en 60 ml de suspensión y se incubaron durante 7 días con agitación a 37°C. Después de 7 días se recogió el sobrenadante por centrifugación a 1500xg para

eliminar las células y después se filtró por 0,22 µm en estéril.

Cuantificación por Proteína-G de DVD-Ig anti-B/anti-C y de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds

Se ensayó el nivel de expresión en los sobrenadantes de mamífero mediante un método de Proteína-G por HPLC. Se llevaron a cabo múltiples ciclos de purificación por Proteína-G en cantidades conocidas de anticuerpo estándar y cantidades desconocidas de muestras. Se midió el área del pico de elución seguido por la absorbancia a 280 nm y se creó una curva estándar de cantidades conocidas de anticuerpo frente al área del pico de elución. Se usó la curva estándar para convertir las áreas del pico de elución de la muestra a cantidades de anticuerpo con el ajuste de los diferentes coeficientes de extinción. La purificación por Proteína-G consistió en muestras aplicadas a 1 ml/min a una columna de 1 ml de Gammabind Plus Sepharosa (GE Healthcare) equilibrada en fosfato sódico 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4. La columna se lavó con fosfato sódico 20 mM, NaCl 40 mM, pH 7,4 y el material unido se eluyó con glicina/HCl 50 mM pH 2,7. El nivel de expresión de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds y de DVD-Ig anti-B/anti-C se muestran en la Tabla 6. La introducción de la estabilización por disulfuro de la región variable anti-B (región v exterior) tuvo un efecto mínimo en el nivel de expresión.

**Tabla 6**

<b>Nivel de expresión de DVD-Ig anti-B/anti-C y de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds</b>	
	Nivel de expresión (µg/ml)
DVD-Ig anti-B/anti-C	5,9
DVD-Ig anti-B/anti-C + ds	4,3

15

Purificación por Proteína-A de DVD-Ig anti-B/anti-C y de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds

Los sobrenadantes de ~50 ml filtrados por 0,22 µm se concentraron hasta ~2 ml usando concentradores Amicon Ultra-15 con un filtro de corte de peso molecular de 30 kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante. Se aplicaron 1,8 ml de sobrenadante concentrado a 1 ml/min a una columna de 1 ml de MabSelect SuRe (GE Healthcare) equilibrada en fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. La columna se lavó con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 y el material unido se eluyó con citrato sódico 0,1 M pH 3,4. El pico de elución se recogió y se ajustó el pH a ~pH 7 con Tris/HCl 2 M pH 8,5. La elución de pH ajustado se concentró y se diafiltró en fosfato 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 usando concentradores Amicon Ultra-15 con un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugación a 4000xg en un rotor oscilante.

25 Análisis de SDS-PAGE de DVD-Ig anti-B/anti-C y de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds purificados por Proteína-A

A 26 µl de muestra purificada por Proteína-A a ~0,1 mg/ml en PBS se añadieron 10 µl de tampón de migración de muestra LDS 4X (Invitrogen). Para muestras no reducidas, se añadieron 4 µl de NEM 100 mM y para muestras reducidas se añadieron 4 µl de agente reductor 10X (Invitrogen). Las muestras se agitaron mediante vortex, se incubaron a 100°C durante 3 min, se enfriaron y se centrifugaron a 12.500 rpm durante 30 segs. Las muestras preparadas se cargaron, 30 µl/~19 µg, en un gel de SDS Tris/Glicina acrilamida 4-20% y se corrió durante 110 min. a 125V. Los geles se tiñeron para tinción de proteínas con Azul de Coomassie y se destiñeron con ácido acético al 7,5%, véase la Figura 6. En condiciones reductoras, tanto DVD-Ig anti-B/anti-C como DVD-Ig anti-B/anti-C + ds corrieron como 2 bandas principales en las mismas posiciones, una a ~65 kDa y otra a ~40 kDa. La banda de ~65 kDa corresponde a la cadena pesada y la banda de ~40 kDa a la cadena ligera. En condiciones no reductoras, la banda principal tanto para DVD-Ig anti-B/anti-C como para DVD-Ig anti-B/anti-C + ds está a ~250 kDa, sin embargo, la banda principal para DVD-Ig anti-B/anti-C + ds es ligeramente más baja que la banda principal para DVD-Ig anti-B/anti-C. Este tamaño aparente ligeramente más pequeño del DVD-Ig estabilizado con disulfuro es indicativo de la formación del enlace de disulfuro estabilizador.

Análisis de exclusión por tamaño de DVD-Ig anti-B/anti-C y DVD-Ig anti-B/anti-C + ds purificados por Proteína-A

40 Se analizaron muestras purificadas por Proteína-A mediante HPLC de exclusión por tamaño. Las muestras se separaron en una columna Superdex 200 10/300 GL Tricorn (GE Healthcare) desarrollada con un gradiente isocrático de PBS pH 7,4 a 1 ml/min. La detección del pico fue a 280 nm. La introducción de la estabilización con disulfuro de la región variable anti-B (región v exterior) aumentó el porcentaje de monómero en un 3%. El aumento en el monómero se debió a una disminución en especies de alto peso molecular

45 Análisis de estabilidad térmica de DVD-Ig anti-B/anti-C y DVD-Ig anti-B/anti-C + ds purificados por Proteína-A

Se añadieron, por cuadruplicado, 9 µl de muestra a 0,1 mg/ml en PBS a 1 µl de stock 30X de colorante fluorescente naranja Spyro en una placa de 384 pocillos. La placa se calentó a 20-99°C usando un sistema de PCR a tiempo real rápido 7900HT y se midió la fluorescencia (excitación a 490 nm, emisión a 530 nm). Se usa el software para calcular

el(los) punto(s) de inflexión de las curvas de desplegamiento, véase Tabla 7. La introducción de la estabilización por disulfuro de la región variable anti-B (región v exterior) ha aumentado la estabilidad térmica de esta región variable exterior por ~4°C.

**Tabla 7**

<b>Análisis de estabilidad térmica de DVD-Ig anti-B/anti-C y de DVD-Ig anti-B/anti-C + ds purificados por Proteína-A</b>		
	Tm (°C)	S.D. (°C)
DVD-Ig anti-B/anti-C	67,4	0,2
DVD-Ig anti-B/anti-C + ds	71,7	0,3

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de anticuerpo que comprende:

un polipéptido de cadena pesada que comprende:



5 en donde  $VH_1$  es un primer dominio variable de cadena pesada de anticuerpo,  $VH_2$  es un segundo dominio variable de cadena pesada de anticuerpo, CH es un dominio constante  $CH_1$  de cadena pesada de anticuerpo,  $X_1$  representa un péptido,  $X_2$  representa una región Fc de anticuerpo, n es 0 o 1 e y es independientemente 1 o 2, y

un polipéptido de cadena ligera que comprende:



en donde  $VL_1$  es un primer dominio variable de cadena ligera de anticuerpo,  $VL_2$  es un segundo dominio variable de cadena ligera de anticuerpo, C es un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo,  $X_1$  representa un péptido l y n es 0 o 1,

15 en donde la cadena pesada y la cadena ligera están alineadas de manera que  $VH_1$  y  $VL_1$  forman un primer dominio de unión y  $VH_2$  y  $VL_2$  forman un segundo dominio de unión, en donde:

hay un enlace disulfuro entre  $VH_1$  y  $VL_1$ ; y

en donde el enlace disulfuro está entre los residuos de cisteína VH44 y VL100 numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.

20 2. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además un enlace disulfuro entre  $VH_2$  y  $VL_2$ .

3. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el péptido  $X_1$  es un péptido de unión a albúmina.

25 4. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el péptido es un enlazador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SED ID Nos.: 10-79 y 96-97.

5. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Una molécula de anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 5 para usar en tratamiento.

30

Figura 1

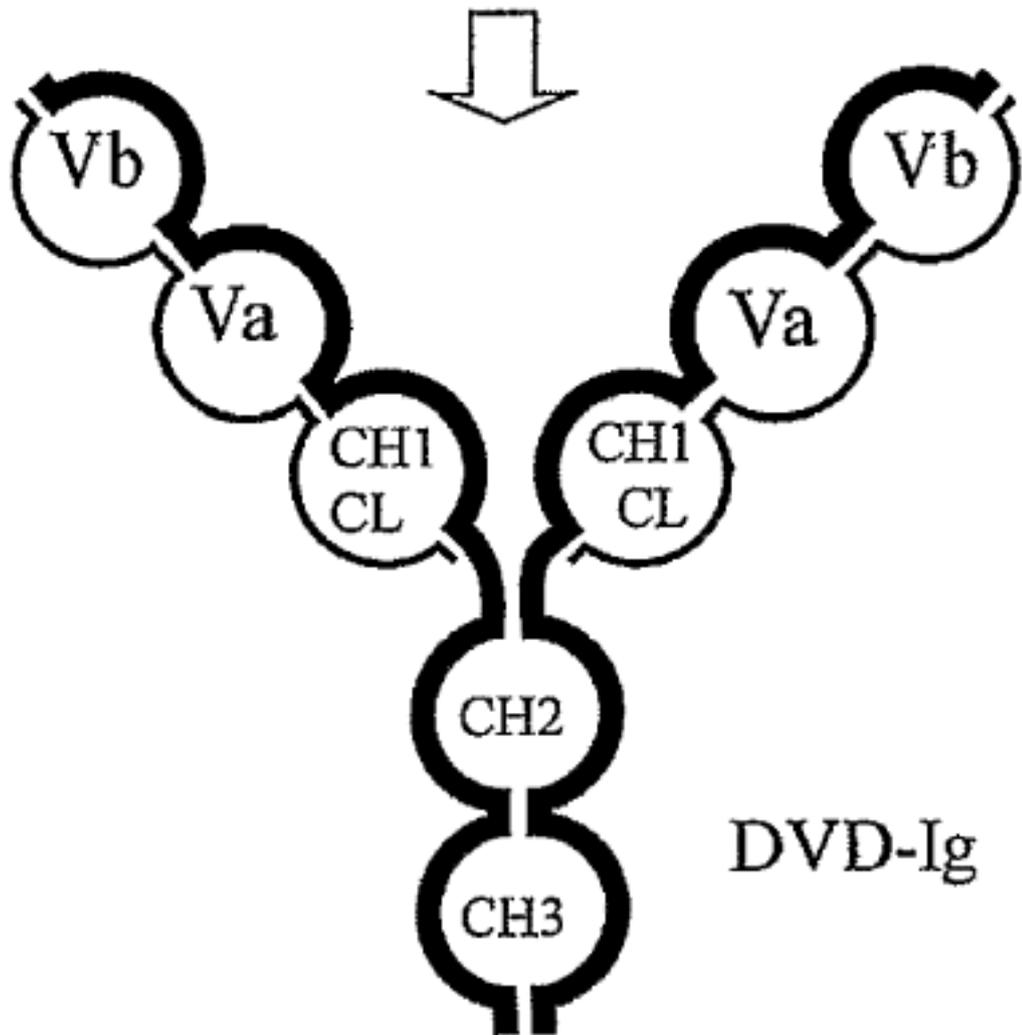


Figura 2

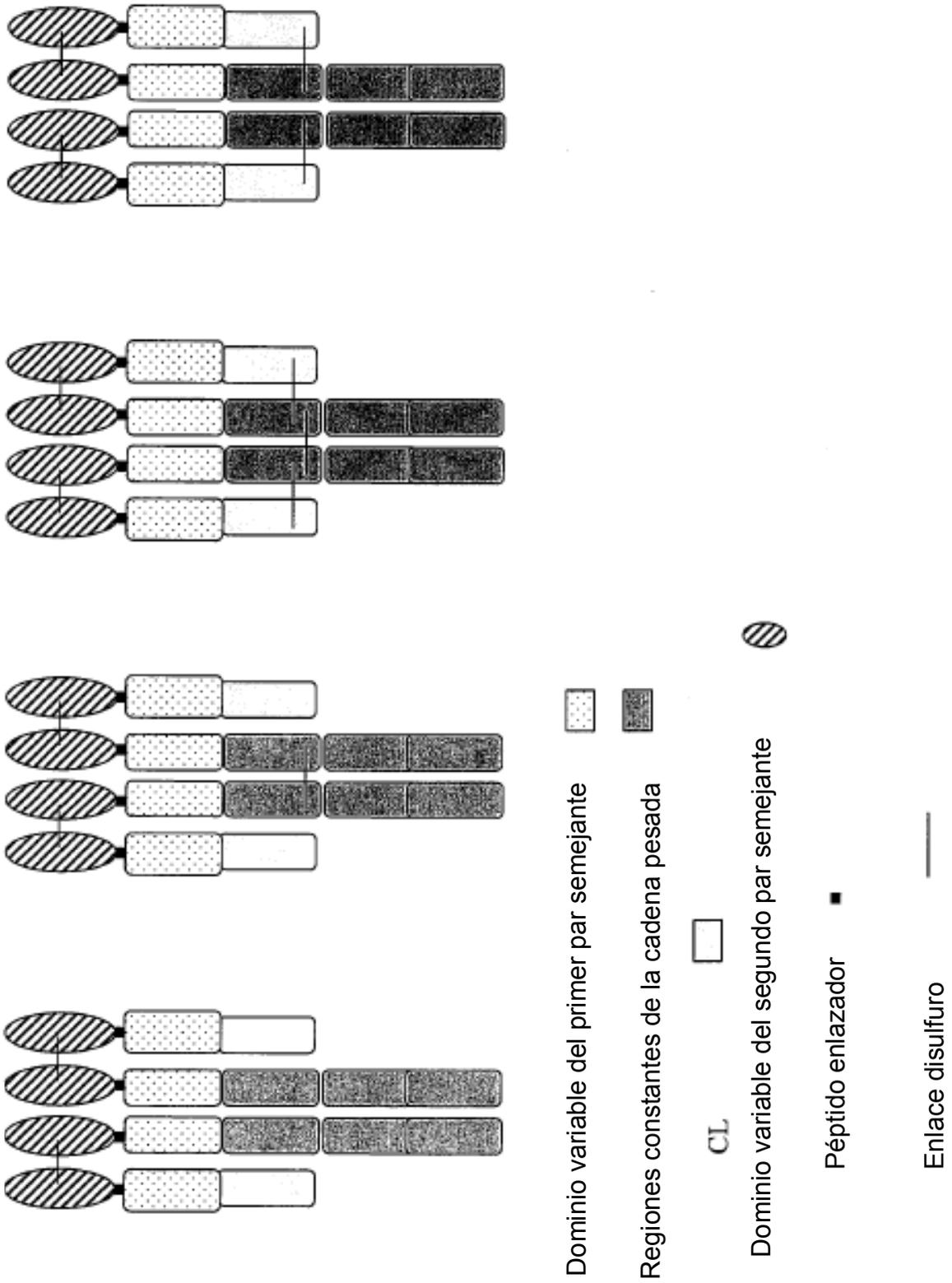


Figura 3

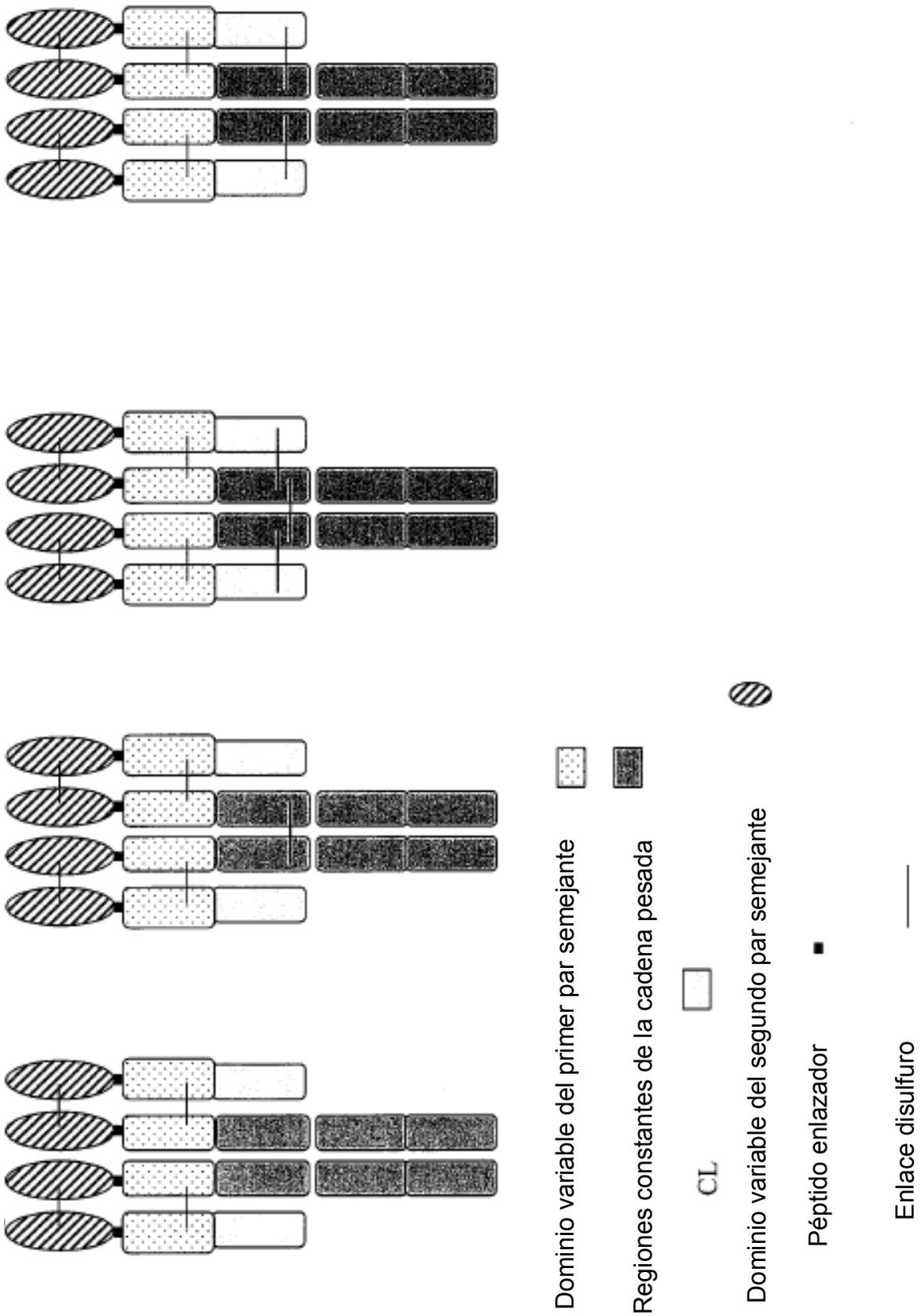


Figura 4

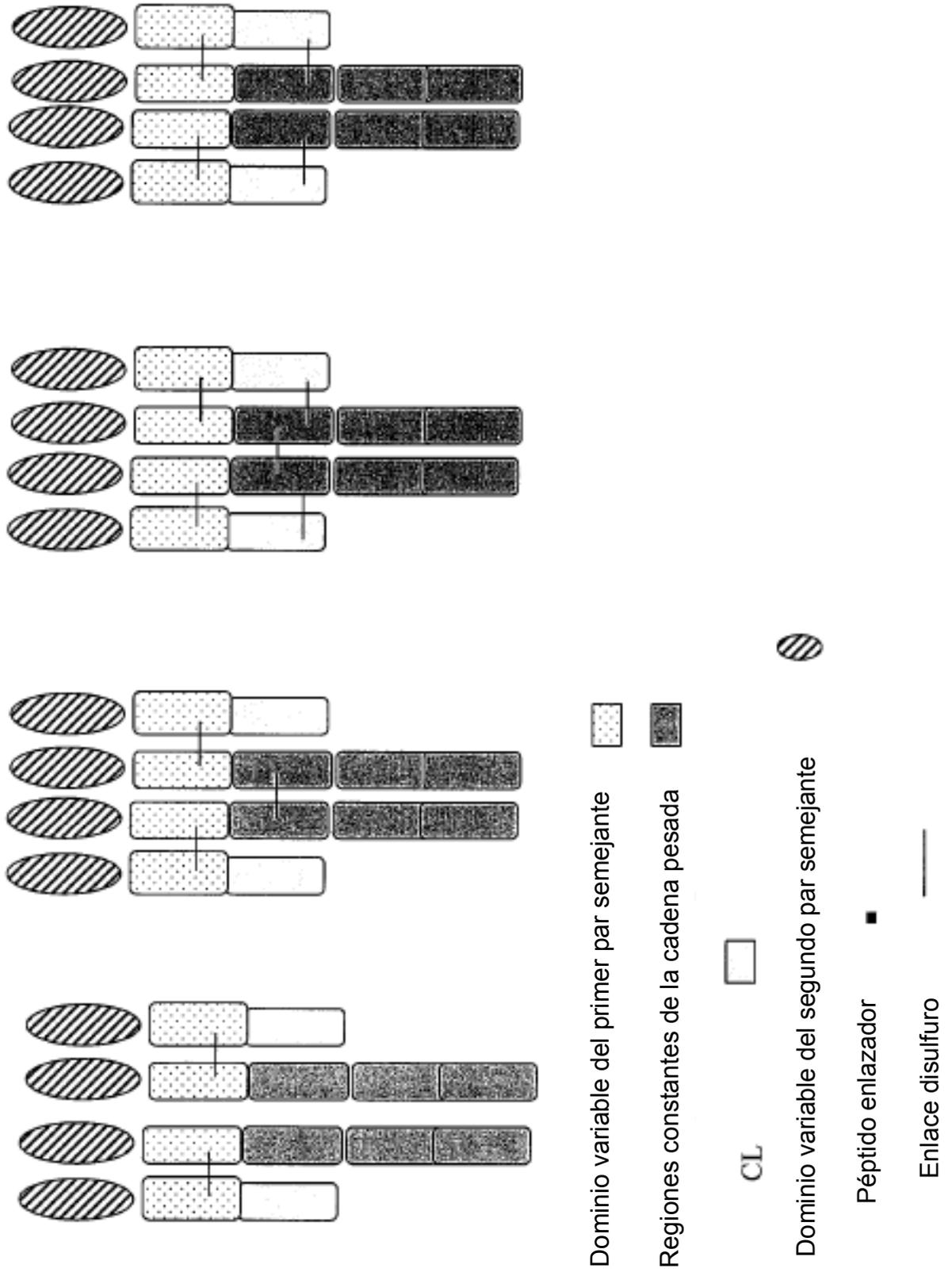


Figura 5

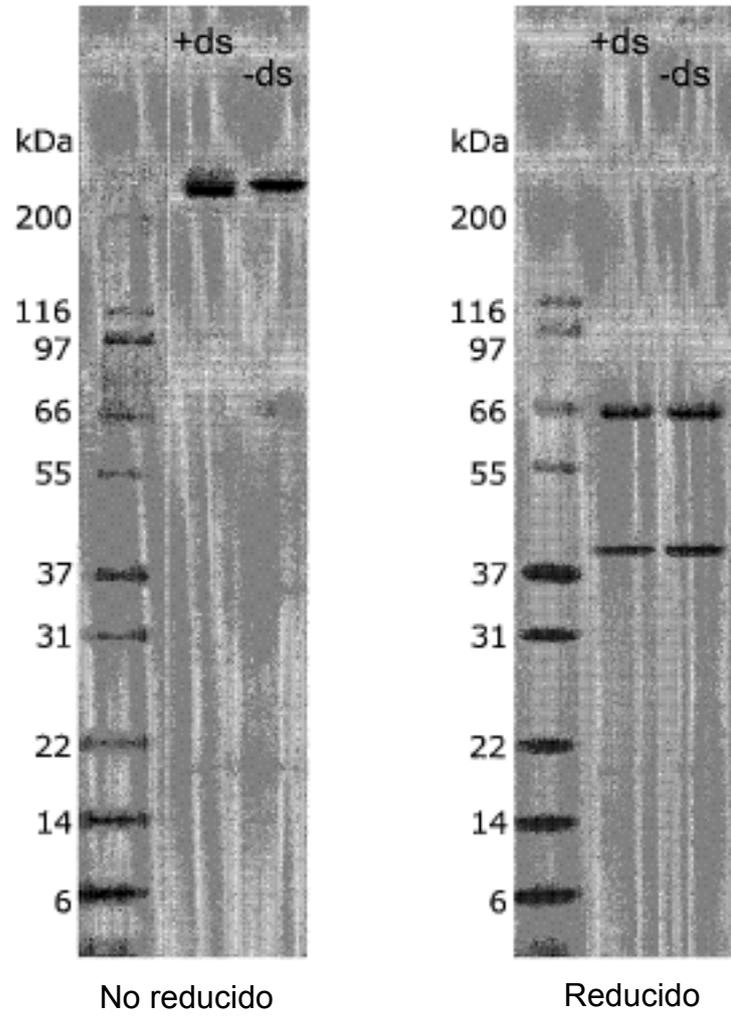


Figura 6

