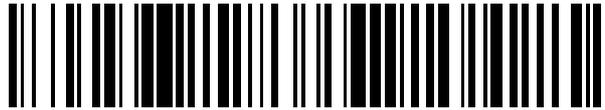


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 348**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/EP2015/080536**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097313**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15816156 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3233910**

54 Título: **Dímeros de Nanobody con uniones cisteína**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094179 P
31.03.2015 US 201562140611 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2020

73 Titular/es:

ABLYNX NV (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

JANSSEN, DANIEL;
SCHOTTE, PETER;
DESCAMPS, FRANCIS;
BOUTTON, CARLO y
CASTEELS, PETER

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 772 348 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

Dímeros de Nanobody con uniones cisteína

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a dímeros que comprenden un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en los que cada uno de dichos polipéptidos primero y segundo comprende al menos un V_{HH} y una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína (preferiblemente en el extremo C), en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido se unen covalentemente a través de un enlace disulfuro entre el resto de cisteína de dicho primer polipéptido y el resto de cisteína de dicho segundo polipéptido, en los que el dímero superó a los constructos de referencia, por ejemplo constructos multivalentes y multiespecíficos relacionados, en diversos ensayos. La presente invención proporciona métodos para producir los dímeros de la invención. La presente invención usa además dominios variables (tal como se definen en el presente documento) y polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables (también denominados “*polipéptidos usados en la invención*”) obtenibles mediante los métodos de la presente divulgación, así como compuestos (también denominados “*compuestos de la invención*”) que comprenden tales dominios variables y/o polipéptidos acoplados a uno o más grupos, residuos o restos.

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican para tales dominios variables y/o polipéptidos; a hospedar células que comprenden tales ácidos nucleicos y/o que expresan o son capaces de expresar tales dominios variables y/o polipéptidos; a composiciones, y en particular a composiciones farmacéuticas, que comprenden tales dominios variables y/o polipéptidos, compuestos, ácidos nucleicos y/o células huésped; y a usos de tales dominios variables, polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y/o composiciones, en particular con propósitos profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico.

Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención quedarán claros a partir de la descripción adicional en el presente documento.

Antecedentes

Con más de 20 anticuerpos monoclonales (Acm) aprobados para terapia, y muchos más en desarrollo clínico, esta clase de moléculas se ha convertido en una modalidad de tratamiento establecida para una variedad de enfermedades (Reichert (2011) MAbs 3:76-99; Nelson *et al.* (2010) Nat Rev Drug Discov 9: 767-74). Sin embargo, las enfermedades complejas tales como el cáncer o los trastornos inflamatorios suelen ser de naturaleza multifactorial, implicando una redundancia de ligandos y receptores mediadores de enfermedad, así como interferencia entre las cascadas de señales. El bloqueo de múltiples dianas o múltiples sitios en una diana debe dar como resultado una eficacia terapéutica mejorada. La capacidad limitada de las terapias con anticuerpos monoclonales convencionales para inducir una actividad antitumoral significativa ha conducido al desarrollo de anticuerpos biespecíficos; que pueden unirse simultáneamente a dos antígenos diferentes (Kontermann (2012) mAbs 4:182-197). Durante la última década, la doble selección como diana con anticuerpos biespecíficos ha surgido como una alternativa a la terapia combinada o al uso de mezclas. El concepto de doble selección como diana con anticuerpos biespecíficos se basa en la selección como diana de múltiples moléculas modificadoras de enfermedad con un fármaco. Desde una perspectiva tecnológica y reguladora, esto hace que el desarrollo sea menos complejo porque la fabricación, las pruebas preclínicas y clínicas se reducen a una única molécula biespecífica (Kontermann (2012) citado anteriormente). La terapia con un único fármaco de doble selección como diana en lugar de combinaciones también debe ser menos complicada para los pacientes.

Los anticuerpos biespecíficos pueden generarse mediante medios bioquímicos o genéticos. Las tecnologías recombinantes han producido una diversa gama de anticuerpos biespecíficos, generando 45 formatos en las últimas dos décadas (Byrne *et al.* (2013) Trends Biotechnol. 31, 621-32). A pesar de esta variedad de topologías, el enfoque no es adecuado para todas las combinaciones de proteínas. La fusión de proteínas a través de sus extremos N o C-terminal puede dar como resultado una reducción o pérdida de bioactividad y pueden observarse rendimientos de expresión variables debido a complicaciones en el plegamiento y el procesamiento (Schmidt (2009) Curr. Opin. Drug Discovery Dev. 12, 284-295; Baggio *et al.* (2004) Diabetes 53, 2492-2500; Chames y Baty (2009) mAbs 1, 539-47).

Un enfoque alternativo para generar terapias biespecíficas es la conjugación química usando reactivos de acoplamiento homo o heterobifuncionales (Doppalapudi *et al.* (2010) Proc Natl Acad Sci USA 107: 22611-6). Hasta ahora, este ha sido un método menos satisfactorio para producir tales conjugados. Una deficiencia fundamental en las técnicas químicas empleadas en esta área ha sido su dependencia de la modificación de los residuos de lisina. Hay un promedio de 100 residuos de lisina por anticuerpo convencional, y su distribución es uniforme en toda la topología de superficie del anticuerpo o fragmentos del mismo, tales como regiones Fab, Fc y de dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD, por sus siglas en inglés). Como tal, las técnicas de conjugación que usan residuos de lisina se reticularán aleatoriamente con prácticamente todas las áreas de la molécula de anticuerpo, dando como resultado una mezcla altamente heterogénea de productos con propiedades impredecibles.

Se proporciona una estrategia para superar este problema mediante la inserción de aminoácidos no naturales, que

permiten la introducción específica de sitio de agentes de unión químicos. Sin embargo, la sustitución por el aminoácido no natural es a menudo incompleta, y los rendimientos de expresión son generalmente bajos debido a la toxicidad celular de los aminoácidos artificiales a las altas concentraciones necesarias.

5 Otro enfoque para superar los problemas con la reticulación aleatoria se proporciona mediante la mutagénesis dirigida al sitio, en la que se introduce un único residuo de cisteína nucleófilo en un sitio deseado en un anticuerpo. Los residuos de cisteína tienen una baja abundancia natural en proteínas, pero a menudo se encuentran ligados en enlaces disulfuro intramoleculares, proporcionando integridad estructural y funcional, por lo que los residuos de cisteína libres carecen de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (Fodje y Al-Karadaghi (2002) Prot. Eng. Des. Sel. 15, 353-358).
10 Sin embargo, el control de la reticulación intramolecular frente a intermolecular es muy difícil de lograr con estos reactivos. Puede lograrse cierto control mediante la elección adecuada de los parámetros de reacción, tales como razón proteína/reactivo, pH, fuerza iónica, etc., pero los resultados siguen siendo insatisfactorios.

15 El documento WO2004/03019 plantea la hipótesis de que pueden unirse entre sí dominios variables para formar ligandos multivalentes, por ejemplo, mediante la provisión de dAc, cada uno con una cisteína en el extremo C-terminal del dominio, uniéndose las cisteínas por enlaces disulfuro, usando un procedimiento de acoplamiento químico que usa 2,2'-ditiopiridina (2,2'-DTDP) y un monómero reducido. Sin embargo, la 2,2'-DTDP es un irritante, lo que limita su uso práctico. Además, su uso está limitado además puesto que la 2,2'-DTDP también es un disulfuro reactivo que moviliza Ca^{2+} de las células. No sólo el documento WO2004/03019 no menciona si este método es realmente factible, especialmente sin perturbar y redistribuir los enlaces tiol intramoleculares, sino que en vista de las propiedades de la 2,2'-DTDP, deben tomarse medidas laboriosas para eliminar por completo este agente.

20 Baker *et al.* (2014, Bioconjugate Chem., DOI: 10.1021/bc5002467) describe un constructo de anticuerpo biespecífico a través de la reducción y la unión en puente de enlaces disulfuro de fragmentos de anticuerpo, usando un agente de reticulación de bis-dibromomaleimida sintetizado.

25 Carlsson *et al.* (1978 Biochem J. 173:723-737) proponen un procedimiento de tiolación para proteínas que usa 3-(2-piridilditio)propionato de n-succinimidilo que da como resultado una conjugación proteína-proteína reversible. Sin embargo, el procedimiento requiere una purificación extensa. Además, se ha notificado una disminución de la actividad al seguir el protocolo (Carlsson *et al.* 1978). Carlsson *et al.* (1978) no menciona si el procedimiento puede usarse para anticuerpos o fragmentos de los mismos.

30 En general, la reticulación intermolecular mediante la introducción de residuos de cisteína es limitada, ya que la mutagénesis de cisteína conduce comúnmente a rendimientos de expresión reducidos y propiedades no deseados, tales como susceptibilidad a la dimerización no deseada, formación de disulfuro mixto o la mezcla de disulfuro (Schmiedl *et al.* (2000) J. Immunol. Methods 242, 101-14; Junutula *et al.* (2008) Nat. Biotechnology 26, 925-32; Albrecht *et al.* (2004) Bioconjugate Chem. 15, 16-26).

35 Graziano y Guptill analizan métodos para crear anticuerpos biespecíficos unidos químicamente Fab' x Fab' mediante el uso de tioles libres generados tras reducir los enlaces disulfuro intercatenarios de cadena pesada de los fragmentos F(ab')₂. Sin embargo, las condiciones deben elegirse de tal manera que se logre una reducción eficiente de los disulfuros intercatenarios de cadena pesada sin una reducción extensa de los enlaces disulfuro de cadena pesada-ligera. Se observó que los anticuerpos biespecíficos creados con el método de o-fenilendimaleimida (o-PDM) pueden ser más estables que los generados mediante el reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) o DTNB), pero fue más difícil purificar anticuerpos biespecíficos generados mediante o-PDM hasta homogeneidad bioquímica. Otra desventaja distintiva del método de o-PDM es la necesidad de tener un número impar de enlaces disulfuro intercatenarios de cadena pesada en la molécula de anticuerpo que va a tratarse con maleimida (Graziano y Guptill (2004) Capítulo 5 Chemical Production of Bispecific Antibodies páginas 71-85 de: Methods in Molecular Biology, vol. 283: Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods; editado por: C. M. Niemeyer © Humana Press Inc., Totowa, NJ). Esto impide su aplicación en la construcción de anticuerpos biespecíficos humano-humano.

40 Una estrategia adicional para mejorar el tratamiento, especialmente el tratamiento de cáncer, es usar conjugados anticuerpo-fármaco (CAF). Aunque actualmente hay más de 50 CAF distintos en ensayos clínicos, varios de los cuales son activos, sigue habiendo problemas importantes para desarrollar, purificar y prevenir la toxicidad de los CAF. En primer lugar, hay poco control sobre las propiedades fisicoquímicas, tales como la heterogeneidad de los CAF debido al número de fármacos conjugados por anticuerpo, la PK/biodistribución, la carga útil y el vehículo de administración. Por ejemplo, muchos fármacos se conjugan a través de lisinas a anticuerpos. Tal como se mencionó anteriormente, dado que las lisinas están dispersas por la totalidad de un anticuerpo, esto da lugar a una razón fármaco-anticuerpo difícil de controlar. Además, este acoplamiento interfiere en el concepto biespecífico al hacer uso también del acoplamiento de lisina. Además, la mayoría de los fármacos usados en el tratamiento de cáncer son muy hidrófobos, lo que da como resultado un perfil de agregación, PK y biodistribución impredecible y en su mayoría desfavorable del resto de CAF. Esto es especialmente cierto para pequeños fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos convencionales tienen un tamaño de aproximadamente 150 kD, mientras que los fármacos tienen en promedio un tamaño de aproximadamente 1 kD. Por tanto, la razón de tamaño de anticuerpo:fármaco es de aproximadamente 150:1. En gran
55 contraste con un anticuerpo convencional, un fragmento de anticuerpo, tal como un ISVD, tiene un tamaño de sólo aproximadamente 15 kD. Por consiguiente, la razón de tamaño de ISVD:fármaco es de sólo 15:1, es decir, 10 veces
60
65

menor que para los anticuerpos convencionales. Por consiguiente, las características hidrófobas de un fármaco tienen una influencia desproporcionadamente mayor sobre las propiedades físicoquímicas del fragmento de anticuerpo conjugado. De hecho, un problema principal con los fragmentos de anticuerpo conjugados es la agregación (Feng *et al.* 2014 *Biomedicines* 2:1-13). Los análisis sugieren además que los constructos macromoleculares del tamaño de IgG presentan un equilibrio favorable entre el aclaramiento sistémico y la extravasación vascular, lo que da como resultado una captación tumoral máxima (Dane Wittrup *et al.* 2012 *Methods Enzym.* 503 capítulo 10, págs. 255-268). Estas dificultades limitan eficazmente el uso de fármacos conjugados con fragmentos de anticuerpo más pequeños.

Ji Xuemei *et al.*, (2013 en *Appl Microb biotechn* 97:8547-8558) describen que anticuerpos de un único dominio anti-TNFa humano de *Camelidae* dimerizados covalentemente a través de un enlace disulfuro intermolecular expresados en la levadura *Pichia pastoris* mostrarían una actividad neutralizante superior.

El documento WO 2010/125187, a nombre de Ablynx, se refiere a un método para la producción de anticuerpos de dominios basándose en el hallazgo de que la expresión de anticuerpos de dominios en huéspedes distintos de *E. coli* da como resultado una variante relacionada con el producto que carece de la formación de al menos un enlace disulfuro, pero sin embargo, en la mayoría de los casos, es completamente funcional.

El documento WO 2007/042289, a nombre de Ablynx, se refiere a Nanobodies y polipéptidos contra EGFR e IGF-IR.

Simmons *et al.*, (2006 en *J Immunol Methods* 315:171-184) describen y someten a prueba estrategias de dimerización para fragmentos de anticuerpo de un único dominio IgNAR de tiburón, incluyendo la multimerización en disolución, la multimerización a través de un dhlx, la multimerización a través de una unión disulfuro de región bisagra y la multimerización a través de la unión de cabeza con cola en un formato de cadena sencilla.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; también llamado HER-1) es un miembro de la familia de cinasas HER, junto con HER-2, HER-3 y HER-4. El EGFR se sobreexpresa en una variedad de tumores humanos, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, de mama, de cabeza y cuello, gástrico, colorrectal, de esófago, de próstata, de vejiga, renal, de páncreas y de ovario. La activación de EGFR provoca señalización que puede conducir a división celular, aumento de la motilidad, angiogénesis y disminución de la apoptosis. Estos efectos están mediados por una serie compleja de mecanismos de señalización, tales como la participación de rutas de proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K).

El EGFR también se ha implicado en otras varias enfermedades, tales como artritis inflamatoria y la hipersecreción de mucosidad en los pulmones.

Muchos de los anticuerpos de selección como diana de EGFR tales como IMC-C225 (Erbix, Imclone), EMD72000 (Merck Darmstadt), ABX-EGF (Abgenix), h-R3 (theraCIM, YM Biosciences) y Humax-EGFR (Genmab) se aislaron como anticuerpos que impiden la unión del ligando al receptor. Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos ni los fármacos disponibles actualmente es completamente eficaz para el tratamiento de cáncer, y la mayoría están limitados por una intensa toxicidad.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

En vista de su modularidad, los dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) y especialmente los Nanobodies (nanocuerpos) son excepcionalmente adecuados para combinarse en constructos multivalentes. Una manera conveniente y preferida de generar constructos multivalentes es mediante fusión genética de ácidos nucleicos individuales que codifican para ISVD a través de enlaces amida, en los que una secuencia de nucleótidos que codifica para un ISVD se acopla a través de su ácido nucleico de extremo 3'-terminal al ácido nucleico de extremo 5'-terminal de otra secuencia de nucleótidos que codifica para ISVD, si es necesario a través de ligadores (ácido nucleico) de diversas longitudes. Por tanto, los ISVD se acoplan mediante enlaces amida, posiblemente mediante ligadores peptídicos.

Los ISVD comprenden enlaces disulfuro intramoleculares entre cisteínas para mantener la integridad y la funcionalidad del resto. Se ha demostrado extensamente que después de la fusión genética de secuencias de nucleótidos que codifican para ISVD, la propiedad intrínseca para formar enlaces disulfuro canónicos (también designados como intramoleculares) no se ve afectada en los ISVD individuales tras la traducción.

En vista de la facilidad y versatilidad de la fusión genética, la conjugación química de los ISVD no es un método preferido, especialmente puesto que requiere métodos arduos para acoplar selectivamente los ISVD en un sitio predeterminado, sin obstaculizar los enlaces disulfuro intramoleculares y/o usar componentes no potencialmente peligrosos por sí mismos.

La presente invención proporciona un método conveniente en el que se facilita la dimerización intermolecular mediante

enlaces disulfuro entre dos polipéptidos, sin sustancialmente ninguna perturbación aberrante o implicación de enlaces disulfuro intramoleculares de V_{HH} . Este método usa la introducción de una cisteína en la extensión C-terminal de un polipéptido que comprende además V_{HH} .

5 La presente invención también proporciona métodos para producir los dímeros de la invención. En particular, la presente invención se refiere a un método para producir dímeros (de polipéptido), que comprende al menos las etapas de:

(i) proporcionar un primer polipéptido, en el que dicho primer polipéptido comprende

- 10
- al menos un V_{HH} y
 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal;

15 (ii) proporcionar un segundo polipéptido, en el que dicho segundo polipéptido comprende

- al menos un V_{HH} y
 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal; y
- 20

(iii) oxidar el resto de tiol de dicho resto de cisteína en la extensión C-terminal de dicho primer polipéptido y el resto de tiol de dicho resto de cisteína en la extensión C-terminal de dicho segundo polipéptido, opcionalmente mediante la adición de iones de cobre oxidantes (Cu^{2+}), a un pH de 6,5 a un pH de 7,5 a un derivado de disulfuro cistina; caracterizado porque la integridad de los V_{HH} se mantiene y dicha cistina es el único enlace disulfuro intermolecular presente en el dímero; produciéndose de ese modo dichos dímeros.

25

Preferiblemente, la etapa de reducir dicha cistina [C-terminal] de dicho dímero se realiza en condiciones en las que los enlaces disulfuro intramoleculares de dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido permanecen oxidados. Dicho de otro modo, se mantiene la integridad de los V_{HH} . El método opcionalmente comprende además la etapa de reducir dicha cistina (ubicada de manera C-terminal) de dicho dímero.

30

Se descubrió además sorprendentemente que los dímeros de la invención superaron a los constructos de referencia, por ejemplo constructos multivalentes y multispecíficos relacionados, en diversos ensayos. Los constructos de referencia consisten en los mismos polipéptidos que los dímeros de la presente invención, pero los constructos de referencia se generaron mediante fusión genética de ácidos nucleicos que codifican para estos polipéptidos, por lo que un primer polipéptido se acopla a un segundo polipéptido mediante enlaces amida en un sentido de N-terminal a C-terminal. En particular, los dímeros de la invención pueden unirse a una diana con una afinidad (medida adecuadamente y/o expresada como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o una velocidad k_{off} mejor que la de los constructos de referencia, por ejemplo bivalentes relacionados. Por otro lado, los dímeros de la invención, incluso cuando contienen dos V_{HH} de unión a albúmina, mostraron un perfil de biodistribución similar al de la referencia que contiene sólo un V_{HH} de unión a albúmina. Además, los dímeros de la invención mostraron inesperadamente una internalización mejorada en comparación con los constructos de referencia, especialmente en células con baja expresión de diana. Como la internalización es crucial para una buena eficacia; una internalización mejorada conducirá probablemente a una mejor eficacia. Además, una internalización mejorada puede reducir los efectos secundarios, tales como toxicidad, puesto que se necesita menos fármaco y se liberará menos fármaco de la diana. La internalización de los dímeros en las células con baja expresión de diana puede ampliar la gama de tumores accesibles para el tratamiento y disminuir las posibilidades de desarrollar resistencia a los fármacos. Por otro lado, los dímeros de la invención mostraron un perfil de biodistribución favorable, similar al de los constructos de referencia.

35

40

45

50

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un dímero que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que dicho primer polipéptido comprende al menos un V_{HH} y una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína (preferiblemente en el extremo C-terminal); en el que dicho segundo polipéptido comprende al menos un V_{HH} y una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína (preferiblemente en el extremo C-terminal); y en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido se unen covalentemente mediante un enlace disulfuro entre el resto de cisteína de dicho primer polipéptido y el resto de cisteína dicho segundo polipéptido.

55

Como tal, la presente invención se refiere a un dímero (de polipéptido) que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido se unen covalentemente a través de un enlace disulfuro ubicado de manera C-terminal.

60

Los inventores observaron además que los dímeros de la invención tienen características funcionales y de unión favorables inesperadas. Estas características también se conservaron durante periodos prolongados de tiempo, sin ninguna pérdida aparente o sustancial de potencia. Esto hace que los dímeros sean útiles para el almacenamiento y el transporte. Por consiguiente, la presente invención se refiere además a un método para almacenar polipéptidos que

65

comprenden restos de cisteína reactivos, que comprende al menos la etapa de oxidar el resto de tiol de dicho resto de cisteína reactivo al derivado de disulfuro cistina, inactivando temporalmente de ese modo dichos restos de cisteína reactivos, en el que dichos polipéptidos comprenden además enlaces cistina (internos).

5 Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que los dímeros podrían ser particularmente adecuados como reserva para uso instantáneo tal como, por ejemplo, el acoplamiento de grupos funcionales usando la cisteína C-terminal, por ejemplo mediante la química de la maleimida. Se desarrolló un protocolo con condiciones reductoras suaves, en las que el puente disulfuro intermolecular del dímero se redujo para activar el grupo tiol de los polipéptidos constituyentes. Las condiciones optimizadas dieron como resultado la reducción del disulfuro que forma el dímero sin reducir los puentes disulfuro de ISVD canónicos internos. Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para generar polipéptidos que comprenden restos de cisteína reactivos, que comprende al menos las etapas de:

- 15 (i) proporcionar polipéptidos dimerizados a través de un enlace de cistina;
 (ii) reducir dicho enlace de cistina;

generándose de este modo polipéptidos que comprenden restos de cisteína reactivos. Preferiblemente, dicho enlace de cistina está ubicado en el extremo C-terminal de dichos polipéptidos. Preferiblemente, las condiciones reductoras de dicha etapa (ii) se eligen de tal manera que los enlaces de cistina internos no se reduzcan.

Además, la presente invención también proporciona métodos para conjugar cargas útiles a los polipéptidos de la invención, con una razón fármaco-anticuerpo (RFA) muy controlada y una pureza superior al 95%. De manera completamente inesperada, la conjugación del polipéptido con una carga útil (RFA = 1) no tiene ningún efecto sobre el perfil de biodistribución. Además, estos polipéptidos conjugados demostraron toxicidad celular e inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para tratar sujetos que usan los polipéptidos de la invención.

Leyendas de las figuras

- 30 Figura 1 Representación gráfica esquemática de los constructos usados.
- Figura 2 FACS de unión competitiva.
- 35 Figura 3 Bloqueo de la fosforilación de EGFR mediada por EGF en células HER14 (EGF 0,5 mM).
- Figura 4 Representación esquemática de la reducción de dímeros de disulfuro de polipéptidos con extendidos con GGC C-terminales.
- 40 Figura 5 Perfil de SEC de polipéptidos extendidos con cisteína reducida.
- Figura 6 Maleimida-val-cit-MMAE.
- 45 Figura 7 Análisis de SDS-PAGE de T0238-00001-mc-val-cit-PAB-MMAE (ABL100-NC003-1). 1) marcadores Novex; 2) dímero T0238-00001; 3) T0238-00001 reducido (DTT 10 mM, 2-8°C, durante la noche); 4) mezcla de conjugación en bruto de ABL100-NC003-1; 5) ABL100-NC003-1.
- Figura 8 Cromatogramas de interacción hidrófoba superpuestos para T023800001-A reducido, T023800001-A oxidado y T0238-00001-mc-val-cit-PAB-MMAE.
- 50 Figura 9 Destrucción celular *in vitro* de conjugados polipéptido-MMAE: monitorización impedimétrica del efecto de diferentes concentraciones de Nanobodies no conjugados y conjugados sobre la proliferación de células MDA-MB-468, medido como fluctuaciones en el índice celular (IC) normalizado. La flecha indica el punto de tiempo de la administración de Nanobody (es decir, 20 h después de la siembra) y la línea de puntos indica el punto final (es decir, 116 h tras la siembra) para el análisis de datos. El índice celular obtenido del crecimiento celular en ausencia de Nanobody se toma como control.
- 55 Figura 10 Efecto dependiente de la dosis de los polipéptidos no conjugados y conjugados con MMAE.
- 60 Figura 11 Eficacia *in vivo* de los conjugados polipéptido-MMAE.
- Figura 12 Modificación y radiomarcado de Nb usando NCS-Bz-Df y ⁸⁹Zr.
- 65 Figura 13 % de ID/g promediado para 3 polipéptidos.

Figura 14 Curva dosis-respuesta de polipéptidos y constructos internalizados.

Descripción detallada de la invención

- 5 Cualquier comentario de la técnica anterior en la totalidad de la memoria descriptiva no debe considerarse de ninguna manera como un reconocimiento de que tal técnica anterior se conoce ampliamente o forma parte del conocimiento general común en el campo.
- 10 A menos que se indiquen o se definan de otro modo, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que estará claro para el experto. Por ejemplo, se hace referencia a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al.* eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old *et al.* "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.* "Immunology" (6.ª ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt *et al.* Roitt's Essential Immunology, 10ª ed. Blackwell Publishing, R.U. (2001); y Janeway *et al.* "Immunobiology" (6ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como a los antecedentes de la técnica generales citados en el presente documento.
- 20 A menos que se indique de otro modo, todos los métodos, las etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se*, tal como tendrá claro el experto. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales convencionales y a los antecedentes de la técnica generales mencionados en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en los mismos; así como, por ejemplo, las siguientes revisiones: Presta 2006 (Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6): 640-56), Levin y Weiss 2006 (Mol. Biosyst. 2(1): 49-57), Irving *et al.* 2001 (J. Immunol. Methods 248 (1-2): 31-45), Schmitz *et al.* 2000 (Placenta 21 Supl. A: S106-12), Gonzales *et al.* 2005 (Tumour Biol. 26(1): 31-43), que describen técnicas para la modificación por ingeniería de proteínas, tales como maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.
- 30 Se considera que una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos está "*(en) (forma) esencialmente aislada*", por ejemplo, en comparación con el medio de reacción o el medio de cultivo del que se ha obtenido, cuando se ha separado de al menos otro componente con el que se asocia generalmente en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otra macromolécula o componente biológico o al menos un contaminante, impureza o componente minoritario. En particular, una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos se considera "esencialmente aislada" cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces y hasta 1000 veces o más. Una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que está "en forma esencialmente aislada" preferiblemente es esencialmente homogénea, según se determina usando una técnica adecuada, tal como una técnica de cromatografía adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 40 A menos que el contexto requiera claramente otra cosa, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, los términos "comprenden", "que comprenden" y similares deben interpretarse en un sentido incluyente en lugar de un sentido excluyente o exhaustivo; es decir, en el sentido de "incluyendo, pero sin limitarse a".
- 45 Por ejemplo, cuando se dice que una secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o un polipéptido "comprende" otra secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos u otro polipéptido, respectivamente, o "consiste esencialmente en" otra secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos u otro polipéptido, esto puede significar que esta última secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o último polipéptido se ha incorporado en la primera secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o primer polipéptido, respectivamente, pero más habitualmente esto significa generalmente que la primera secuencia de nucleótidos, secuencia de aminoácidos o primer polipéptido comprende dentro de su secuencia un tramo de nucleótidos o residuos de aminoácido, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que esta última secuencia, independientemente de cómo se haya generado u obtenido la primera secuencia mencionada (que puede ser, por ejemplo, mediante cualquier método adecuado descrito en el presente documento). Por medio de un ejemplo no limitativo, cuando se dice que un polipéptido usado en la invención comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, esto puede significar que dicha secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina se ha incorporado a la secuencia del polipéptido usado en la invención, pero más habitualmente esto significa generalmente que el polipéptido usado en la invención contiene dentro de su secuencia la secuencia de los dominios variables únicos de inmunoglobulina independientemente de cómo se haya generado u obtenido dicho polipéptido usado en la invención. Además, cuando se dice que un ácido nucleico o una secuencia de nucleótidos comprende otra secuencia de nucleótidos, el primer ácido nucleico o la primera secuencia de nucleótidos mencionado es preferiblemente tal que, cuando se expresa en un producto de expresión (por ejemplo, un polipéptido), la secuencia de aminoácidos codificada por esta última secuencia de nucleótidos forma parte de dicho producto de expresión (dicho de otro modo, que esta última secuencia de nucleótidos está en el mismo marco de lectura que la primera secuencia de ácido nucleico o nucleótidos más grande mencionada).
- 65

Por “consiste esencialmente en” o “esencialmente consiste en” y similares significa que el polipéptido usado en el presente documento es exactamente el mismo que el polipéptido de la invención o corresponde al polipéptido de la invención que tiene un número limitado de residuos de aminoácido, tal como 1-20 residuos de aminoácido, por ejemplo 1-10 residuos de aminoácido y preferiblemente 1-6 residuos de aminoácido, tal como 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 residuos de aminoácido, añadidos en el extremo amino-terminal, en el extremo carboxilo-terminal, o tanto en el extremo amino-terminal como en el extremo carboxilo-terminal del dominio variable único de inmunoglobulina.

Una secuencia de aminoácidos (tal como un dominio variable único de inmunoglobulina, un anticuerpo, un polipéptido usado en la invención, o generalmente una proteína o un polipéptido de unión a antígeno o un fragmento de los mismos) que puede (específicamente) unirse a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína específicos (o al menos por una parte, un fragmento o epítipo de los mismos) se dice que es “*contra*” o “*dirigido contra*” dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

La afinidad indica la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se facilita comúnmente mediante la K_D , o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como una constante de asociación, K_A , que es igual a $1/K_D$ y tiene unidades de $(\text{mol/litro})^{-1}$ (o M^{-1}). En la presente memoria descriptiva, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas se expresará principalmente en términos de valor de K_D de su interacción; estando claro para el experto que, en vista de la relación $K_A = 1/K_D$, que especifica la fuerza de la interacción molecular mediante su valor de K_D también puede usarse para calcular el valor de K_A correspondiente. El valor de K_D caracteriza la fuerza de una interacción molecular también en un sentido termodinámico, ya que está relacionado con el cambio de energía libre (DG) de unión mediante la conocida relación $DG = RT \cdot \ln(K_D)$ (de manera equivalente $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$), donde R es igual a la constante de los gases, T es igual a la temperatura absoluta y ln indica el logaritmo neperiano.

La K_D para las interacciones biológicas que se consideran significativas (por ejemplo, específicas) están normalmente en el intervalo de $10^{-10}M$ (0,1 nM) a $10^{-5}M$ (10000 nM). Cuanto más fuerte es una interacción, menor es su K_D .

La K_D también puede expresarse como la razón de la constante de velocidad de disociación de un complejo, indicada como k_{off} , con respecto a la velocidad de su asociación, indicada como k_{on} (de modo que $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ y $K_A = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$). La velocidad de disociación k_{off} tiene unidades de s^{-1} (donde s es la notación de unidad del SI de segundo). La velocidad de k_{on} tiene unidades de $M^{-1}s^{-1}$. La velocidad de asociación puede variar desde $10^2 M^{-1}s^{-1}$ hasta aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$, aproximándose a la constante de velocidad de asociación limitada por difusión para las interacciones bimoleculares. La velocidad de disociación está relacionada con la semivida de una interacción molecular dada mediante la relación $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$. La velocidad de disociación puede variar desde $10^{-6} s^{-1}$ (complejo casi irreversible con una $t_{1/2}$ de varios días) hasta $1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,69 s$).

La unión específica de una proteína de unión a antígeno, tal como un ISVD, a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se* incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competencia de tipo sándwich, y sus diferentes variantes conocidas *per se* en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente documento.

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse a través de diferentes técnicas conocidas *per se*, tal como la técnica bien conocida de biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR) (véase, por ejemplo, Ober *et al.* 2001, Intern. Immunology 13:1551-1559) en la que una molécula se inmoviliza en el chip de biosensor y la otra molécula se hace pasar sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo que producen mediciones de K_{on} , k_{off} y, por tanto, valores de K_D (o K_A). Esto puede realizarse, por ejemplo, usando los instrumentos bien conocidos BIACORE® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). El ensayo de exclusión cinética (KINEXA®) (Drake *et al.* 2004, Analytical Biochemistry 328: 35-43) mide los eventos de unión en disolución sin marcar las parejas de unión y se basa en excluir cinéticamente la disociación de un complejo.

El sistema de inmunoensayo GYROLAB® proporciona una plataforma para el bioanálisis automatizado y el tiempo de respuesta rápido de muestras (Fraley *et al.* 2013, Bioanalysis 5:1765-74).

También estará claro para el experto que la K_D medida puede corresponder a la K_D aparente si el proceso de medición influye de alguna manera en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo, mediante artefactos relacionados con el recubrimiento en el biosensor de una molécula. Además, puede medirse una K_D aparente si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la otra molécula. En tal situación, la afinidad medida puede verse afectada por la avidéz de la interacción por las dos moléculas.

El término “*especificidad*” tiene el significado que se le facilita en el párrafo n) en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079; y tal como se menciona en el presente documento, se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigénicos a los que puede unirse una molécula de unión a antígeno o una proteína de unión a antígeno particular (tal como un dímero de la invención o polipéptido usado en la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en la afinidad y/o avidéz, tal como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079, que también describe algunas técnicas preferidas para medir la unión

entre una molécula de unión a antígeno (tal como un polipéptido o ISVD usado en la invención) y el antígeno pertinente. Normalmente, las proteínas de unión a antígeno (tales como los dominios variables únicos de inmunoglobulina y/o polipéptidos de la invención) se unirán a su antígeno con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litro/moles o más, y preferiblemente de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y más preferiblemente de 10^8 a 10^{12} litro/moles). Cualquier valor de K_D mayor de 10^{-4} mol/litro (o cualquier valor de K_A menor de 10^4 litro/mol) generalmente se considera que indica unión inespecífica. Preferiblemente, un dominio variable único de inmunoglobulina monovalente de la divulgación se unirá al antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competencia de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas *per se* en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente documento. Tal como estará claro para el experto, y tal como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079, la constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente. Los métodos para determinar la constante de disociación estarán claros para el experto y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079.

Otro enfoque que puede usarse para evaluar la afinidad es el procedimiento de ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas) de 2 etapas de Friguet *et al.* 1985 (J. Immunol. Methods 77: 305-19) Este método establece una medición de equilibrio de unión en fase de disolución y evita posibles artefactos relacionados con la adsorción de una de las moléculas sobre un soporte tal como plástico.

Sin embargo, la medición precisa de K_D puede requerir mucha mano de obra y, como consecuencia, a menudo se determinan valores de K_D aparente para evaluar la fuerza de unión de dos moléculas. Cabe señalar que siempre que todas las mediciones se realicen de manera sistemática (por ejemplo, manteniendo inalteradas las condiciones de ensayo) pueden usarse mediciones de K_D aparente como una aproximación de la K_D verdadera y, por tanto, en el presente documento K_D y K_D aparente deben tratarse con igual importancia o relevancia.

Finalmente, cabe señalar que en muchas situaciones el científico experimentado puede juzgar que es conveniente determinar la afinidad de unión en relación con alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la fuerza de unión entre las moléculas A y B, puede usarse, por ejemplo una molécula de referencia C que se sepa que se une a B y que esté marcada adecuadamente con un grupo fluoróforo o cromóforo u otro resto químico, tal como biotina para una fácil detección en un ELISA o FACS (*fluorescent activated cell sorting*, clasificación de células activadas por fluorescencia) u otro formato (el fluoróforo para la detección de fluorescencia, el cromóforo para la detección de absorción de luz, la biotina para la detección mediante ELISA mediada por estreptavidina). Normalmente, la molécula de referencia C se mantiene a una concentración fija y la concentración de A se varía para una concentración o cantidad dada de B. Como resultado, se obtiene un valor de CI_{50} correspondiente a la concentración de A la que la señal medida para C en ausencia de A se reduce a la mitad. Siempre que se conozcan $K_{D, ref}$, la K_D de la molécula de referencia, así como la concentración total c_{ref} de la molécula de referencia, puede obtenerse la K_D aparente para la interacción A-B a partir de la siguiente fórmula: $K_D = CI_{50} / (1 + c_{ref}/K_{D, ref})$. Obsérvese que si $c_{ref} \ll K_{D, ref}$, $K_D \approx CI_{50}$. Siempre se realice la medición de la CI_{50} de manera sistemática (por ejemplo, manteniendo fija c_{ref}) para los agentes de unión que se comparan, puede evaluarse la fuerza o la estabilidad de una interacción molecular mediante la CI_{50} y esta medición se considera equivalente a K_D o a K_D aparente en la totalidad de este texto.

La concentración inhibitoria mitad del máximo (CI_{50}) es una medida de la efectividad de un compuesto para inhibir una función biológica o bioquímica, por ejemplo un efecto farmacológico. Esta medida cuantitativa indica cuánto ISV o Nanobody (inhibidor) es necesario para inhibir un proceso biológico dado (o componente de un proceso, es decir, una enzima, célula, un receptor celular, una quimiotaxia, anaplasia, metástasis, invasividad, etc.) a la mitad. Dicho de otro modo, es la concentración inhibitoria (CI) mitad del máximo (50%) de una sustancia (CI del 50% o CI_{50}). La CI_{50} de un fármaco puede determinarse construyendo una curva dosis-respuesta y examinando el efecto de diferentes concentraciones de antagonista, tal como el ISV o Nanobody de la divulgación, sobre la reversión de la actividad agonista. Pueden calcularse valores de CI_{50} para un antagonista dado, tal como el ISV o el Nanobody de la divulgación, determinando la concentración necesaria para inhibir la mitad de la respuesta biológica máxima del agonista.

El término concentración eficaz mitad del máximo (CE_{50}) se refiere a la concentración de un compuesto que induce una respuesta a medio camino entre la línea base y el máximo después de un tiempo de exposición específico. En el presente contexto, se usa como una medida de la potencia de un polipéptido, ISV o Nanobody. La CE_{50} de una curva dosis-respuesta graduada representa la concentración de un compuesto a la que se observa el 50% de su efecto máximo. La concentración se expresa preferiblemente en unidades molares.

En los sistemas biológicos, pequeños cambios en la concentración de ligando producen generalmente cambios rápidos en la respuesta, siguiendo una función sigmoidea. El punto de inflexión en el que el aumento de la respuesta con la concentración de ligando creciente comienza a ralentizarse es la CE_{50} . Esto puede determinarse matemáticamente mediante la derivación de la línea de ajuste óptimo. Es conveniente basarse en un gráfico para la estimación en la mayoría de los casos. En caso de que la CE_{50} se proporcione en la sección de ejemplos, se diseñaron los experimentos

para reflejar la KD de la manera más precisa posible. Dicho de otro modo, los valores de CE_{50} pueden considerarse entonces como valores de KD. El término “KD promedio” se refiere al valor de KD promedio obtenido en al menos 1, pero preferiblemente más de 1, tal como al menos 2 experimentos. El término “promedio” se refiere al término matemático “promedio” (sumas de datos divididas entre el número de elementos en los datos).

5 También está relacionado con CI_{50} que es una medida de la inhibición de un compuesto (inhibición del 50%). Para ensayos de unión competitiva y ensayos de antagonistas funcionales, la CI_{50} es la medida resumen más común de la curva dosis-respuesta. Para los ensayos de agonista/estimulador, la medida resumen más común es la CE_{50} .

10 El término “fusión genética”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al acoplamiento de ácidos nucleicos individuales que codifican para ISVD a través de enlaces amida, en los que una secuencia de nucleótidos que codifica para un ISVD se acopla a través de su ácido nucleico de extremo 3'-terminal a través de un enlace fosfodiéster al ácido nucleico de extremo 5'-terminal de otra secuencia de nucleótidos que codifica para un ISVD, si es apropiado a través de ligadores (ácido nucleico) de diversas longitudes, por ejemplo una secuencia de nucleótidos que codifica para un ISVD se acopla a través de su ácido nucleico de extremo 3'-terminal a través de un enlace fosfodiéster al ácido nucleico de extremo 5'-terminal de una secuencia ligadora, que se acopla a través de su ácido nucleico de extremo 3'-terminal a través de un enlace fosfodiéster al ácido nucleico de extremo 5'-terminal de otra secuencia de nucleótidos que codifica para un ISVD (es decir, los ISVD y opcionalmente los ligadores se fusionan genéticamente). La fusión genética puede realizarse según los protocolos convencionales de ADN recombinante (citados anteriormente), o tal como se describe en la sección de Ejemplos, por ejemplo Garaicoechea *et al.* (2008, J Virol. 82: 9753-9764).

25 Las secuencias de aminoácidos se interpretan como un único aminoácido o una secuencia no ramificada de dos o más aminoácidos, dependiendo del contexto. Las secuencias de nucleótidos se interpretan como una secuencia no ramificada de 3 o más nucleótidos.

30 Los aminoácidos son aquellos L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en proteínas que se producen de manera natural y se enumeran en la tabla 1 a continuación. Aquellas secuencias de aminoácidos que contienen D-aminoácidos no están destinadas a estar abarcadas por esta definición. Cualquier secuencia de aminoácidos que contenga aminoácidos modificados de manera postraduccional puede describirse como la secuencia de aminoácidos que se traduce inicialmente usando los símbolos que se muestran en la tabla a continuación con las posiciones modificadas; por ejemplo, hidroxilaciones o glicosilaciones, pero estas modificaciones no se mostrarán explícitamente en la secuencia de aminoácidos. Esta definición abarca cualquier péptido o proteína que pueda expresarse como una secuencia modificada de uniones, reticulaciones y agentes de ocupación de extremos, enlaces no peptidílicos, etc.

35 Tabla 1: Aminoácidos comunes

Código de 1 letra	Código de 3 letras	Nombre
A	Ala	Alanina
B	Asx	Ácido aspártico o asparagina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	Hia	Histidina
I	Ile	Isoleucina
J	Xle	Isoleucina o leucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
O	Pyl	Pirrolisina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina

S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
U	Scy	Selenocisteína
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
X	Xxx	Poco común o sin especificar
Y	Tyr	Tirosina
Z	Glx	Ácido glutámico o glutamina

Los términos “proteína”, “péptido”, “proteína/péptido” y “polipéptido” se usan de manera intercambiable en la totalidad de la divulgación y cada uno tiene el mismo significado con los propósitos de esta divulgación. Cada término se refiere a un compuesto orgánico compuesto por una cadena lineal de dos o más aminoácidos. El compuesto puede tener diez o más aminoácidos; veinticinco o más aminoácidos; cincuenta o más aminoácidos; cien o más aminoácidos, doscientos o más aminoácidos e incluso trescientos o más aminoácidos. El experto en la técnica apreciará que los polipéptidos comprenden generalmente menos aminoácidos que las proteínas, aunque no existe un punto de corte reconocido en la técnica del número de aminoácidos que distinguen un polipéptido y una proteína; que los polipéptidos pueden prepararse mediante síntesis química o métodos recombinantes; y que las proteínas se producen generalmente *in vitro* o *in vivo* mediante métodos recombinantes tal como se conoce en la técnica.

Para facilitar la comprensión de la invención, se proporcionará una breve discusión de la terminología usada en relación con la invención. Por convención, el enlace amida en la estructura primaria de los polipéptidos está en el orden en que se escriben los aminoácidos, en el que el extremo de amina (extremo N-terminal) de un polipéptido está siempre a la izquierda, mientras que el extremo de ácido (extremo C-terminal) está a la derecha.

El polipéptido usado en la invención comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), que es un V_{HH} , y una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal. En su forma más simple, el polipéptido usado en la invención consiste en un V_{HH} seguido de (unido o conjugado con) una cisteína.

La extensión C-terminal está presente de manera C-terminal con respecto al último residuo de aminoácido (habitualmente un residuo de serina) del último ISVD (ubicado de manera más C-terminal), que comprende un resto de cisteína, preferiblemente el resto de cisteína de la invención está presente o situado en el extremo C-terminal de la extensión C-terminal.

En el contexto de la presente invención, la extensión C-terminal consiste en al menos un aminoácido, es decir, el resto de cisteína, o una secuencia de aminoácidos de al menos dos residuos de aminoácido a un máximo de 50 residuos de aminoácido que comprenden al menos un residuo de cisteína presente o situado en el extremo C-terminal de la extensión C-terminal, preferiblemente entre 2 y 40 residuos de aminoácido, tal como entre 2 y 30 residuos de aminoácido tal como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ó 20 residuos de aminoácido. Por ejemplo, la extensión C-terminal puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 residuos de aminoácido de los cuales el aminoácido ubicado en el extremo C-terminal es un resto de cisteína tal como, por ejemplo, la extensión C-terminal consiste sólo en un residuo de cisteína; por ejemplo la extensión C-terminal puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 residuos de aminoácido seguidos de un resto de cisteína; por ejemplo la extensión C-terminal puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 residuos de glicina seguidos de un resto de cisteína; por ejemplo la extensión C-terminal puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 residuos de alanina seguidos de un resto de cisteína.

En otro aspecto, el residuo de cisteína está presente o situado en un sitio en la extensión C-terminal que es diferente del extremo C-terminal (terminación C). Por ejemplo, el residuo de cisteína está presente o situado en el residuo de aminoácido delante (en el sentido de 5') del último residuo de aminoácido de la extensión C-terminal (es decir, el penúltimo residuo de aminoácido del polipéptido usado en la invención) o en el residuo de aminoácido delante (en el sentido de 5') de los últimos dos residuos de aminoácido de la extensión C-terminal (es decir, el antepenúltimo residuo de aminoácido del polipéptido usado en la invención). Por ejemplo, la extensión C-terminal puede consistir en 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 residuos de aminoácido (tales como, por ejemplo, glicina o alanina) de los cuales, respectivamente, el primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto o séptimo residuo de aminoácido es una cisteína (es decir, el penúltimo residuo de aminoácido del polipéptido usado en la invención); o la extensión C-terminal puede consistir en 3, 4, 5, 6, 7 u 8 residuos de aminoácido (tales como, por ejemplo, glicina o alanina) de los cuales, respectivamente, el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto o sexto residuo de aminoácido es una cisteína (es decir, el antepenúltimo residuo de aminoácido del polipéptido usado en la invención).

Se facilitan ejemplos preferidos de extensiones C-terminales en la tabla 2.

Tabla 2: Extensiones C-terminales

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
1	C
2	GC
3	GGC
4	GGGC
5	GGGGC
6	AC
7	AAC
8	AAAC
9	AAAAC
10	CG
11	GCG
12	GGCG
13	GGGCG
14	GGGGCG
15	GGGGCGGGG

5 En una realización, la invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende una extensión C-terminal de 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 residuo(s) de aminoácido que comprende(n) un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal. En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicha extensión C-terminal consiste en GlyGlyGlyCys (SEQ ID NO: 4), GlyGlyCys (SEQ ID NO: 3), GlyCys (SEQ ID NO: 2) o Cys (SEQ ID NO:1).

10 En una realización, la invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho polipéptido comprende una extensión C-terminal elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 - 15.

15 La extensión C-terminal puede acoplarse a un ISVD mediante cualquier técnica adecuada conocida por el experto en la técnica tal como, por ejemplo, mediante técnicas de ADN recombinante descritas anteriormente para la fusión genética

20 Un polipéptido usado en la invención puede comprender más de 1 V_{HH} , tal como 2, 3, 4 o incluso más V_{HH} . Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido usado en la invención que comprende al menos dos V_{HH} . Además, la presente invención se refiere a un dímero que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido tal como se describe en el presente documento, en el que dicho primer polipéptido comprende al menos dos V_{HH} y/o dicho segundo polipéptido comprende al menos dos V_{HH} .

25 Los V_{HH} comprendidos en un polipéptido usado en la invención pueden ser iguales o diferentes. En una realización, los V_{HH} puede unirse a la misma diana, independientemente de que los V_{HH} sean iguales o diferentes. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido usado en la invención, que comprende V_{HH} idénticos, uniéndose los V_{HH} a la misma diana, y/o comprendiendo los V_{HH} las mismas CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. En una realización, los V_{HH} puede unirse a diferentes dianas. En una realización, la presente invención se refiere a un dímero que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido tal como se describe en el presente documento, en el que dichos al menos dos V_{HH} de dicho primer polipéptido son idénticos y/o dichos al menos dos V_{HH} de dicho segundo polipéptido son idénticos.

30 En un polipéptido usado en la invención, esté o no comprendido en el dímero de la invención, los V_{HH} pueden ligarse directamente o ligarse mediante un ligador.

35 Las afinidades relativas pueden depender de la ubicación de los ISVD en el polipéptido. Se apreciará que puede elegirse el orden de los ISVD en un polipéptido de la invención (orientación) según las necesidades del experto en la técnica. El orden de los ISVD individuales, así como si el polipéptido comprende un ligador es una cuestión de elección de diseño. Algunas orientaciones, con o sin ligadores, pueden proporcionar características de unión preferidas en comparación con otras orientaciones. Por ejemplo, el orden de un primer ISVD (por ejemplo, ISVD 1) y un segundo

40

ISVD (por ejemplo, ISVD 2) en el polipéptido usado en la invención puede ser (desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal): (i) ISVD 1 (por ejemplo, Nanobody 1) - [ligador] - ISVD 2 (por ejemplo, Nanobody 2); o (ii) ISVD 2 (por ejemplo, Nanobody 2) - [ligador] - ISVD 1 (por ejemplo, Nanobody 1); (en el que el ligador es opcional). Todas las orientaciones están abarcadas por la invención. Los polipéptidos que contienen una orientación de ISVD que proporciona las características de unión deseadas pueden identificarse fácilmente mediante un examen de rutina, por ejemplo, tal como se ejemplifica en la sección de ejemplos.

En los polipéptidos usados en la invención, los dos o más V_{HH} , tales como Nanobodies, pueden ligarse directamente entre sí (tal como, por ejemplo, se describe en el documento WO 99/23221) y/o pueden ligarse entre sí a través de uno o más ligadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos. Los ligadores adecuados para su uso en los polipéptidos usados en la invención estarán claros para el experto en la técnica, y generalmente pueden ser cualquier ligador usado en la técnica para ligar secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, dicho ligador es adecuado para su uso en la construcción de proteínas o polipéptidos que están destinados para uso farmacéutico.

Algunos ligadores particularmente preferidos incluyen los ligadores que se usan en la técnica para ligar fragmentos de anticuerpo o dominios de anticuerpo. Estos incluyen los ligadores mencionados en las publicaciones citadas anteriormente así como, por ejemplo, los ligadores que se usan en la técnica para construir diacuerpos o fragmentos ScFv (a este respecto, sin embargo, debe observarse que, mientras que en diacuerpos y en fragmentos ScFv, la secuencia ligadora usada debe tener una longitud, un grado de flexibilidad y otras propiedades que permitan que los dominios V_H y V_L pertinentes se junten para formar el sitio de unión a antígeno completo, no existe una limitación particular en la longitud o la flexibilidad del ligador usado en el polipéptido usado en la invención, ya que cada V_{HH} , tal como un Nanobody por sí mismo forma un sitio de unión a antígeno completo).

Por ejemplo, un ligador puede ser un aminoácido o una secuencia de aminoácidos adecuado, y en particular secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferiblemente entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos de aminoácido. Algunos ejemplos preferidos de tales secuencias de aminoácidos incluyen ligadores gly-ser, por ejemplo del tipo $(gly_xser_y)_z$, tal como (por ejemplo, $(gly_4ser)_3$ o $(gly_3ser_2)_3$, tal como se describe en el documento WO 99/42077 y los ligadores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las solicitudes de Ablynx mencionadas en el presente documento (véanse, por ejemplo, los documentos WO 06/040153 y WO 06/122825), así como regiones de tipo bisagra, tales como regiones bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural o secuencias similares (tal como se describe en el documento WO 94/04678). Se representan ligadores preferidos en la tabla 3.

Algunos otros ligadores particularmente preferidos son la poli-alanina (tal como AAA), así como los ligadores GS30 (SEQ ID NO: 85 en el documento WO 06/122825) y GS9 (SEQ ID NO: 84 in el documento WO 06/122825).

Está comprendido dentro del alcance de la invención que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del/de los ligador(es) usado(s) (aunque no es crítico, tal como suele ser para los ligadores usados en fragmentos ScFv) pueden tener cierta influencia en las propiedades del dímero final de la invención, incluyendo pero sin limitarse a la afinidad, especificidad o avidéz por una quimiocina, o por uno o más de los otros antígenos. Basándose en la divulgación en el presente documento, el experto podrá determinar el/los ligador(es) óptimo(s) para su uso en un dímero específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Cuando se usan dos o más ligadores en los polipéptidos usados en la invención, estos ligadores pueden ser iguales o diferentes. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto podrá determinar los ligadores óptimos para su uso en un polipéptido específico usado en la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

En los polipéptidos usados en la invención, los V_{HH} pueden estar precedidos por una extensión N-terminal. En el contexto de la presente invención, la extensión N-terminal consiste en una secuencia de aminoácidos de al menos un residuo de aminoácido a un máximo de 40 residuos de aminoácido, preferiblemente entre 2 y 30 residuos de aminoácido, tal como entre 2 y 20 residuos de aminoácido, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 residuos de aminoácido. La extensión N-terminal está presente de manera N-terminal con respecto al primer residuo de aminoácido (es decir, ubicado de la manera más N-terminal, designado generalmente por el aminoácido 1 según la numeración de Kabat) del primer V_{HH} (es decir, ubicado de la manera más N-terminal) en el polipéptido usado en la invención. Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido que comprende una extensión N-terminal.

En una realización, la presente invención se refiere al dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dichos al menos dos V_{HH} de dicho primer polipéptido son idénticos y/o dichos al menos dos V_{HH} de dicho segundo polipéptido son idénticos.

En una realización, el primer polipéptido usado en la invención y el segundo polipéptido usado en la invención del dímero son diferentes.

En una realización, el primer polipéptido usado en la invención y el segundo polipéptido usado en la invención que componen el dímero son iguales. Por consiguiente, el primer polipéptido de la presente invención y el segundo

polipéptido usados en la presente invención son idénticos.

Tabla 3: Algunas secuencias ligadoras usadas en la invención

Nombre del ligador	SEQ ID NO:	Secuencias de aminoácidos
A3	16	AAA
GS5 (5GS)	17	GGGGS
GS7 (7GS)	18	SGGSGGS
GS9 (9GS)	19	GGGSGGGS
GS10 (10GS)	20	GGGSGGGGS
GS15 (15GS)	21	GGGSGGGGSGGGGS
GS18 (18GS)	22	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GS20 (20GS)	23	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GS25 (25GS)	24	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GS30 (30GS)	25	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GS35 (35GS)	26	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

5 Tal como se expone con mayor detalle más adelante, en la presente divulgación, los ISVD pueden derivar de un dominio V_{HH} , V_H o V_L , sin embargo, los ISVD se eligen de manera que no formen pares complementarios de dominios V_H y V_L en los polipéptidos de la divulgación o en los dímeros de la divulgación. El Nanobody, V_{HH} y V_{HH} humanizado son poco habituales en el sentido de que derivan de anticuerpos de camélidos naturales que no tienen cadenas ligeras, y de hecho estos dominios son incapaces de asociarse con cadenas ligeras de camélidos para formar pares de V_{HH} y V_L complementarios. Por tanto, los dímeros y polipéptidos de la presente invención no comprenden ISVD complementarios y/o forman pares de ISVD complementarios tales como, por ejemplo, pares V_{HH}/V_L complementarios.

10 En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho ligador se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO:16-26.

15 Los polipéptidos monovalentes comprenden o consisten esencialmente sólo en una unidad de unión (tal como, por ejemplo, dominios variables únicos de inmunoglobulina). Los polipéptidos que comprenden dos o más unidades de unión (tales como, por ejemplo, los dominios variables únicos de inmunoglobulina) también se denominarán en el presente documento polipéptidos “multivalentes”, y también se hará referencia en el presente documento a que las unidades de unión/dominios variables únicos de inmunoglobulina presentes en tales polipéptidos están en un “formato multivalente”. Por ejemplo, un polipéptido “bivalente” puede comprender dos dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente ligados mediante una secuencia ligadora, mientras que un polipéptido “trivalente” puede comprender tres dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente ligados mediante dos secuencias ligadoras; mientras que un polipéptido “tetraivalente” puede comprender cuatro dominios variables únicos de inmunoglobulina, opcionalmente ligados a través de tres secuencias ligadoras, etc.

20 En un polipéptido multivalente, los dos o más dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser iguales o diferentes, y pueden dirigirse contra el mismo antígeno o determinante antigénico (por ejemplo, contra la(s) misma(s) parte(s) o epítipo(s) o contra partes o epítipos diferentes) o alternativamente pueden dirigirse contra diferentes antígenos o determinantes antigénicos; o cualquier combinación adecuada de los mismos. Los polipéptidos que contienen al menos dos unidades de unión (tales como, por ejemplo, dominios variables únicos de inmunoglobulina) en los que al menos una unidad de unión se dirige contra un primer antígeno de una primera diana y al menos una unidad de unión se dirige contra un antígeno de una segunda diana (por ejemplo, diferente de la primera diana) también se denominarán polipéptidos “multiespecíficos”, y también se hará referencia en el presente documento a que las unidades de unión (tales como, por ejemplo, dominios variables únicos de inmunoglobulina) presentes en tales polipéptidos están en un “formato multiespecífico”. Así, por ejemplo, un polipéptido “bienespecífico” usado en la invención es un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina dirigido contra un primer antígeno de una primera diana y al menos un dominio variable único de inmunoglobulina adicional dirigido contra un segundo antígeno (es decir, diferente del primer antígeno de dicha primera diana), etc.

30 Los “polipéptidos multiparatópicos” tales como, por ejemplo, “polipéptidos biparatópicos” o “polipéptidos triparatópicos”, comprenden o consisten esencialmente en dos o más unidades de unión que tienen cada una un parátipo diferente. En otro aspecto, el polipéptido usado en la invención es un polipéptido multiparatópico (también denominado en el presente documento “polipéptido(s) multiparatópico(s) usado(s) en la invención”) tal como, por ejemplo, “(a) polipéptido(s) biparatópico(s) usado(s) en la invención” o “polipéptido(s) triparatópico(s) usado(s) en la invención”. El termino molécula de unión “multiparatópica” (antígeno) o polipéptido “multiparatópico” tal como se usa

en el presente documento significará un polipéptido que comprende al menos dos (es decir, dos o más) dominios variables únicos de inmunoglobulina, en el que un "primer" dominio variable único de inmunoglobulina se dirige contra una primera diana y un "segundo" dominio variable único de inmunoglobulina se dirige contra la misma primera diana, en el que dichos dominios variables únicos de inmunoglobulina "primero" y "segundo" tienen un parátipo diferente. Por consiguiente, un polipéptido multiparatópico comprende o consiste en dos o más dominios variables únicos de inmunoglobulina que se dirigen contra una primera diana, en el que al menos un "primer" dominio variable único de inmunoglobulina se dirige contra un primer epítipo en dicha primera diana y al menos un "segundo" dominio variable único de inmunoglobulina se dirige contra un segundo epítipo en dicha primera diana diferente del primer epítipo en dicha primera diana.

En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido se elige del grupo de polipéptidos monovalentes, bivalentes, multivalentes, mono-específicos, bio-específicos y multi-específicos.

Tal como se usa en el presente documento, el "diana" de la invención es cualquier antígeno adecuado (por ejemplo, cualquier diana de interés) al que pueda unirse un ISVD. El ISVD usado en la invención es un V_{HH} y puede, por ejemplo, unirse o dirigirse contra un determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o confirmación (cuando sea aplicable) de una diana tal como, por ejemplo, un receptor de tirosina cinasa (RTK) o un receptor acoplado a proteína G (GPCR), por ejemplo que participa en un tumor maligno. Una diana de la invención puede ser cualquier diana, preferiblemente en la superficie de una célula, tal como un receptor celular, por ejemplo que se sabe que participa en tumores malignos. Por ejemplo, las tirosina cinasas receptoras (RTK) y las rutas de transducción de señales mediadas por RTK están involucradas en el inicio del tumor, mantenimiento, la angiogénesis y proliferación vascular. Se han identificado unas 20 clases de RTK diferentes, de las cuales las más estudiadas son: 1. clase I de RTK (familia de receptores de EGF) (familia de ErbB), 2. clase II de RTK (familia de receptores de insulina), 3. clase III de RTK (familia de receptores de PDGF), 4. clase IV de RTK (familia de receptores de FGF), 5. clase V de RTK (familia de receptores de VEGF), 6. clase VI de RTK (familia de receptores de HGF), 7. clase VII de RTK (familia de receptores de Trk), 8. clase VIII de RTK (familia de receptores de Eph), 9. clase IX de RTK (familia de receptores de AXL), 10. clase X de RTK (familia de receptores de LTK), 11. clase XI de RTK (familia de receptores de TIE), 12. clase XII de RTK (familia de receptores de ROR), 13. clase XIII de RTK (familia de receptores de DDR), 14. clase XIV de RTK (familia de receptores de RET), 15. clase XV de RTK (familia de receptores de KLG), 16. clase XVI de RTK (familia de receptores de RYK), 17. clase XVII de RTK (familia de receptores de MuSK). En particular, dianas tales como receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), c-Met, HER3, plexinas, integrinas, CD44, RON y en receptores involucrados en rutas tales como la proteína (MAP) cinasa activada por Ras/Raf/mitógeno y la diana de mamífero de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K)/Akt de la rapamicina (mTOR).

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicha primera diana y dicha segunda diana se eligen independientemente del grupo que consiste en GPCR, tirosina cinasas receptoras, DDR1, discoidina I (antígeno CD167a), DDR2, ErbB-1, C-erbB-2, FGFR-1, FGFR-3, antígeno CD135, antígeno CD 117, proteína tirosina cinasa-1, c-Met, antígeno CD148, C-ret, ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, antígeno CD202b, Trk-A, Trk-B, Trk-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, receptor Notch 1-4, receptor FAS, DR5, DR4, CD47, CX3CR1, CXCR-3, CXCR-4, CXCR-7, proteína 2 de unión a quimiocina, y CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11; MART-1, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), gp100, MAGE-1, HER-2 y antígenos Lewis^Y, CD123, CD44, CLL-1, CD96, CD47, CD32, CXCR4, Tim-3, CD25, TAG-72, Ep-CAM, PSMA, PSA, GD2, GD3, CD4, CD5, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD45, CD52 y CD147; receptores de factores de crecimiento, incluyendo ErbB3 y ErbB4; y receptores de citocinas incluyendo la cadena gamma del receptor de interleucina-2 (antígeno CD132); cadena alfa del receptor de interleucina-10 (IL-10R-A); cadena beta del receptor de interleucina-10 (IL-10R-B); cadena beta-1 del receptor de interleucina-12 (IL-12R-beta1); cadena beta-2 del receptor de interleucina-12 (receptor de IL-12 beta-2); cadena alfa-1 del receptor de interleucina-13 (IL-13R-alfa-1) (antígeno CD213 al); cadena alfa-2 del receptor de interleucina-13 (proteína de unión a interleucina-13); receptor de interleucina-17 (receptor de IL-17); receptor de interleucina-17B (receptor de IL-17B); precursor del receptor de interleucina 21 (IL-21R); receptor de interleucina-1, tipo I (IL-1R-1) (CD121a); receptor de interleucina-1, tipo II (IL-1R-beta) (CDw121b); proteína antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra); cadena alfa del receptor de interleucina-2 (antígeno CD25); cadena beta del receptor de interleucina-2 (antígeno CD122); cadena alfa del receptor de interleucina-3 (IL-3R-alfa) (antígeno CD123).

Las dianas moleculares a modo de ejemplo (por ejemplo, antígenos) incluyen proteínas CD tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD11, CD19, CD20, CD22, CD25, CD33, CD34, CD40, CD52; miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor de EGF (EGFR, HER1, ErbB1), receptor de HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) o HER4 (ErbB4); receptores de macrófagos tales como CR1g; factores de necrosis tumoral tales como TNF α o TRAIL/Apo-2; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mad, p150, p95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y la integrina $\alpha v \beta 3$, incluyendo las subunidades α o β de los mismos; factores de crecimiento y receptores tales como EGF, FGFR (por ejemplo, FGFR3) y VEGF; IgE; citocinas tales como IL1; receptores de citocinas tales como el receptor de IL2; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C; neutrofilinas; efrinas y receptores; netrinas y receptores; Slit y receptores; quimiocinas y receptores de quimiocinas tales como CCL5, CCR4, CCR5; beta-amiloide; factores del complemento, tales como factor D del complemento; lipoproteínas, tales como LDL

oxidada (oxLDL); linfotoxinas, tales como linfotoxina alfa (LTa). Otras dianas moleculares incluyen Tweak, B7RP-1, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), esclerostina, c-kit, Tie-2, c-fms y anti-M1.

5 También se espera que los dímeros de la invención se unirán generalmente a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos que se producen de manera natural o sintéticos de sus dianas.

Por consiguiente, la invención se refiere al dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho V_{HH} de dicho primer polipéptido se une a una primera diana y/o dicho V_{HH} de dicho segundo polipéptido se une a una segunda diana.

10 Por consiguiente, la invención se refiere al dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido se une a una primera diana:

- 15 • con una CI_{50} como máximo de 100 nM, tal como 50 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, preferiblemente incluso como máximo de 2 nM, tal como 1 nM, según se determina mediante una FACS de competencia;
- 20 • con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro;
- con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre $10^2 M^{-1} s^{-1}$ y aproximadamente $10^7 M^{-1} s^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 M^{-1} s^{-1}$ y $10^7 M^{-1} s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 M^{-1} s^{-1}$ y $10^7 M^{-1} s^{-1}$, tal como entre $10^5 M^{-1} s^{-1}$ y $10^7 M^{-1} s^{-1}$; y/o
- 25 • con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) de entre $1 s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, preferiblemente entre $10^{-2} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, tal como entre $10^{-4} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$.

Por consiguiente, la invención se refiere al dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho segundo polipéptido se une a una segunda diana:

- 30 • con una CI_{50} como máximo de 100 nM, tal como 50 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, preferiblemente incluso como máximo de 2 nM, tal como 1 nM, según se determina mediante una FACS de competencia;
- 35 • con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro;
- 40 • con una velocidad de asociación (velocidad k_{on}) de entre $10^2 M^{-1} s^{-1}$ y aproximadamente $10^7 M^{-1} s^{-1}$, preferiblemente entre $10^3 M^{-1} s^{-1}$ y $10^7 M^{-1} s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^4 M^{-1} s^{-1}$ y $10^7 M^{-1} s^{-1}$, tal como entre $10^5 M^{-1} s^{-1}$ y $10^7 M^{-1} s^{-1}$; y/o
- con una velocidad de disociación (velocidad k_{off}) de entre $1 s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, preferiblemente entre $10^{-2} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^{-3} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$, tal como entre $10^{-4} s^{-1}$ y $10^{-6} s^{-1}$.

45 En una realización, la invención se refiere al dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicha primera diana y dicha segunda diana son diferentes.

En una realización, la invención se refiere al dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicha primera diana y dicha segunda diana son idénticas.

50 A menos que se indique de otro modo, el término "secuencia de inmunoglobulina", ya se use en el presente documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, se usa como un término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, los dominios o fragmentos de los mismos (incluyendo, pero sin limitarse a, dominios o fragmentos de unión a antígeno tales como dominios V_{HH} o dominios V_H/V_L , respectivamente). Además, el término "secuencia" tal como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia de V_{HH} " o "secuencia de proteína"), debe entenderse generalmente que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante así como ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican para la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

60 Pueden usarse dominios variables únicos de inmunoglobulina como "unidad de unión", "dominio de unión" o "elemento estructural" (estos términos se usan como intercambiables) para la preparación de un polipéptido, que opcionalmente puede contener uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina adicionales que puede servir como una unidad de unión (es decir, contra el mismo epítipo o uno diferente de la misma diana y/o contra una o más dianas diferentes).

65

El término “dominio variable único de inmunoglobulina” (“ISVD”), usado de manera intercambiable con “dominio variable único” (“SVD”), define moléculas en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un dominio de inmunoglobulina único. Esto distingue los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas “convencionales” o sus fragmentos, en los que dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. Normalmente, en las inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de V_H y V_L contribuirán al sitio de unión a antígeno, es decir, un total de 6 CDR participarán en la formación del sitio de unión a antígeno.

En cambio, el sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un único dominio V_H o V_L. Por tanto, el sitio de unión a antígeno de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por no más de tres CDR.

Los términos “dominio variable único de inmunoglobulina” y “dominio variable único”, por tanto, no comprenden inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos que requieren la interacción de al menos dos dominios variables para la formación de un sitio de unión a antígeno. Sin embargo, estos términos comprenden fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en los que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable único.

En general, los dominios variables únicos serán secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente). Tales dominios variables únicos y sus fragmentos son más preferiblemente tales que comprenden un plegamiento de inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un plegamiento de inmunoglobulina. Como tal, el dominio variable único puede comprender, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de V_L) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de V_H o secuencia de V_{HH}) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una única unidad de unión a antígeno (es decir, una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable único, de modo que la unidad de unión a antígeno única no necesita interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional, como es el caso, por ejemplo, de los dominios variables que están presentes, por ejemplo, en anticuerpos convencionales y fragmentos scFv que requieren interactuar con otro dominio variable, por ejemplo a través de una interacción V_H/V_L, para formar un dominio de unión a antígeno funcional).

En una realización de la divulgación, los dominios variables únicos de inmunoglobulina son secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de V_L) o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de V_H); más específicamente, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de cadena pesada que derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el dominio variable único o el dominio variable único de inmunoglobulina (o un aminoácido que es adecuado para su uso como dominio variable único de inmunoglobulina) puede ser un anticuerpo de dominio (único) (o un aminoácido que es adecuado para su uso como (anticuerpo de dominio único), un “dAc” o dAc (o un aminoácido que es adecuado para su uso como dAc) o un Nanobody (tal como se define en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse a un V_{HH}); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de cualquiera de los mismos.

Para una descripción general de los anticuerpos de dominio (único), también se hace referencia a la técnica anterior citada en el presente documento, así como al documento EP 0368684. Para el término “dAc”, se hace referencia, por ejemplo, a Ward *et al.* 1989 (Nature 341: 544-546), a Holt *et al.* 2003 (Trends Biotechnol. 21: 484-490); así como por ejemplo a los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388, WO 06/059108, WO 07/049017, WO 07/085815 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. También debe observarse que, aunque se prefiere menos en el contexto de la presente divulgación porque no son de origen de mamífero, pueden derivar dominios variables únicos de determinadas especies de tiburones (por ejemplo, los denominados “dominios IgNAR”, véase, por ejemplo, el documento WO 05/18629).

En particular, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un NANOBODY[®] (tal como se define en el presente documento) o un fragmento adecuado del mismo. [Nota: NANOBODY[®], NANOBODIES[®] y NANOCLONE[®] son marcas registradas de Ablynx N.V.]. Para una descripción general de Nanobodies, se hace referencia a la descripción adicional a continuación, así como a la técnica anterior citada en el presente documento, tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 08/020079 (página 16).

Para una descripción más detallada de los V_{HH} y Nanobodies, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302), así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como antecedentes de la técnica generales: los documentos WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; los documentos WO 94/25591, WO 99/37681, WO

00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 y WO 02/48193 de Unilever; los documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); el documento WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; el documento WO 01/90190 del National Research Council de Canadá; el documento WO 03/025020 del Institute of Antibodies; así como los documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825, de Ablynx N.V. y otras solicitudes de patente publicadas de Ablynx N.V. También se hace referencia a la técnica anterior adicional mencionada en estas solicitudes, y en particular a la lista de referencias mencionadas en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153. Tal como se describe en estas referencias, los Nanobodies (en particular las secuencias VHH y los Nanobodies parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más "residuos distintivos" en una o más de las secuencias de entramado. Una descripción adicional de los Nanobodies, incluyendo la humanización y/o camelización de Nanobodies, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o "fusiones de Nanobodies", constructos multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitativos de secuencias ligadoras) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los Nanobodies y sus preparaciones pueden hallarse, por ejemplo en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164.

Por tanto, en el sentido de la presente invención, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" o "dominio variable único" comprende polipéptidos que derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Pueden humanizarse, tal como se describió anteriormente. Además, en la divulgación, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes distintas de camélidos, por ejemplo ratón o humano, que se han "camelizado", tal como se describe por ejemplo en Davies y Riechmann 1994 (FEBS 339: 285-290), 1995 (Biotechnol. 13: 475-479), 1996 (Prot. Eng. 9: 531-537) y Riechmann y Muyldermans 1999 (J. Immunol. Methods 231: 25-38).

En la divulgación, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" abarca secuencias de inmunoglobulina de diferente origen, comprendiendo secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, asno, humano y camélido. También incluye secuencias de inmunoglobulina completamente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o dominios variables únicos de inmunoglobulina de camélido, por ejemplo dAc camelizados según describen Ward *et al.* 1989 (véase, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann 1994, 1995 y 1996) y VH camelizado.

De nuevo, tales dominios variables únicos de inmunoglobulina de la divulgación pueden derivar de cualquier manera adecuada y de cualquier fuente adecuada, y pueden ser, por ejemplo, secuencias de V_{HH} que se producen de manera natural (es decir, de una especie adecuada de camélido) o secuencias de aminoácidos sintéticas o semisintéticas, incluyendo pero sin limitarse a V_{HH} parcial o totalmente "humanizado", secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (y en particular V_H camelizado), así como Nanobodies y/o V_{HH} que se han obtenido mediante técnicas tales como maduración por afinidad (por ejemplo, a partir de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o que se producen de manera natural, tales como secuencias de V_{HH}), injerto de CDR, recubrimiento, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje de PCR usando cebadores solapantes, y técnicas similares para modificar por ingeniería secuencias de inmunoglobulina que conoce bien el experto; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de los anteriores.

La secuencia de aminoácidos y estructura de un dominio variable único de inmunoglobulina puede considerarse, sin limitarse sin embargo a lo mismo, como cuatro regiones de entramado o "FR", que se denominan en la técnica y en el presente documento "región de entramado 1" o "FR1"; "región de entramado 2" o "FR2"; "región de entramado 3" o "FR3"; y "región de entramado 4" o "FR4", respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente.

El número total de residuos de aminoácido en un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente de 112-115, y lo más preferiblemente es de 113.

Tal como se describe más detalladamente en el párrafo q) en las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079, los residuos de aminoácido de un dominio variable único de inmunoglobulina se numeran según la numeración general para dominios VH facilitada por Kabat *et al.* ("numeración de Kabat") ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publicación n.º 91), tal como se aplica a los dominios VHH de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans 2000 (J. Immunol. Methods 240:185-195; véase, por ejemplo, la figura 2 de esta publicación) y, por consiguiente, FR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 1-30, CDR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-35, FR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, FR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 66-94, CDR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102, y FR4 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 103-113.

5 Estará claro, basándose en los ejemplos de secuencias de dominio variable único de inmunoglobulina que se facilitan en el presente documento, así como el documento WO 08/020079, en el documento WO 06/040153 y en las referencias adicionales relacionadas con el dominios variables únicos de inmunoglobulina citadas en los mismos, que el número preciso de residuos de aminoácido también dependerá de la longitud de las CDR específicas que están presentes en el dominio variable único de inmunoglobulina. Con respecto a las CDR, tal como se conoce bien en la técnica, existen múltiples convenciones para definir y describir las CDR de un fragmento VH o VHH, tales como definición de Kabat (que se basa en la variabilidad de secuencia y es la usada más habitualmente) y la definición de Chothia (que se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales). Se hace referencia, por ejemplo, al sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>. Con los propósitos de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, aunque también pueden mencionarse las CDR según Kabat, las CDR se definen lo más preferiblemente basándose en la definición de Abm (que se basa en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular), ya que esto se considera un compromiso óptimo entre las definiciones de Kabat y Chothia. Se hace referencia de nuevo al sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>.

15 En una realización, FR4 comprende la secuencia de aminoácidos C-terminal VTVSS, es decir, cada una de las posiciones 109, 110, 111, 112 y 113. La presente invención también usa ISVD que son V_{HH} y que terminan en las posiciones 109, 110, 111 ó 112. En un aspecto de la invención, FR4 termina con la secuencia de aminoácidos C-terminal VTVS (posiciones 109-112), FR4 termina con la secuencia de aminoácidos C-terminal VTV (posiciones 109-111), FR4 termina con la secuencia de aminoácidos C-terminal VT (posiciones 109-110), o FR4 termina con el aminoácido C-terminal V (posición 109). La extensión C-terminal puede estar presente de manera C-terminal con respecto al último residuo de aminoácido de FR4, por ejemplo V109, T110, V111, S112 o S113, con respecto al último ISVD (ubicado de la manera más C-terminal), en la que el resto de cisteína de la invención está preferiblemente presente o situado en el extremo C-terminal de la extensión C-terminal. En una realización, FR4 comprende la secuencia de aminoácidos C-terminal VTVSS y la extensión C-terminal es una cisteína (por ejemplo, un polipéptido usado en la invención que termina en VTVSSC). En una realización, FR4 comprende la secuencia de aminoácidos C-terminal VTVS y la extensión C-terminal es una cisteína (por ejemplo, un polipéptido usado en la invención que termina en VTVSC). En una realización, FR4 comprende la secuencia de aminoácidos C-terminal VTV y la extensión C-terminal es una cisteína (por ejemplo, un polipéptido usado en la invención que termina en VTVC). En una realización, FR4 comprende la secuencia de aminoácidos C-terminal VT y la extensión C-terminal es una cisteína (por ejemplo, un polipéptido usado en la invención que termina en VTC). En una realización, FR4 comprende el aminoácido C-terminal V y la extensión C-terminal es una cisteína (por ejemplo, un polipéptido usado en la invención que termina en VC).

35 En una realización, la presente divulgación se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento, en el que un ISVD es una secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL), es una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH), deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o deriva de un anticuerpo de cadena pesada.

40 En una realización, la presente divulgación se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento, en el que dicho ISVD se elige del grupo que consiste en anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc, Nanobodies, VHH, VHH humanizados y VH camelizados. Preferiblemente, el ISVD comprende entre 100 y 140 aminoácidos, tal como entre 110 y 130 aminoácidos.

50 En una realización, la presente divulgación se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento, en el que dicho ISVD elegido del grupo que consiste en Nanobodies, VHH, VHH humanizados y VH camelizados comprende entre 105 y 125 aminoácidos, tal como preferiblemente entre 110-120 aminoácidos ácidos, tal como 110, 111, tal como 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 ó 120 aminoácidos, lo más preferiblemente 113 aminoácidos.

55 La presente divulgación se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento, en el que dicho ISVD elegido del grupo que consiste en Nanobodies, VHH, VHH humanizados y VH camelizados termina en la posición de aminoácido 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 119 ó 120, preferiblemente en la posición de aminoácido 113 según la numeración de Kabat.

60 La presente divulgación se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento, en el que dicho ISVD se elige del grupo que consiste en anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc y VH camelizados, en el que dichos anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc y VH camelizados derivan de un VH.

65 La presente divulgación se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento, en el que dichos

anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc y VH camelizados comprenden 110-130 aminoácidos, preferiblemente 115-127 aminoácidos, tal como 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 ó 127 aminoácidos, lo más preferiblemente 123 aminoácidos. Preferiblemente, en el que dichos anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc y VH camelizados terminan en el aminoácido 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 ó 130 preferiblemente en el aminoácido 123, según la numeración de Kabat.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento, en el que dicho ISVD se elige del grupo que consiste en anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc y secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc, en el que dichos anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc o secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso tales como dAc derivan de un VL. Preferiblemente, en el que dichos anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc y secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc comprenden 100-120 aminoácidos, preferiblemente 105-115 aminoácidos, tal como 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 ó 120 aminoácidos ácidos, lo más preferiblemente 108 aminoácidos. Preferiblemente, en el que dichos anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio único, secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como anticuerpo de dominio, dAc y secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso como dAc, terminan en el aminoácido 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 ó 120, preferiblemente en el aminoácido 108, según la numeración de Kabat.

En un aspecto específico de la invención, un dímero de la invención puede tener una semivida aumentada, en comparación con el dímero correspondiente de la invención. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitativos, de tales dímeros estarán claros para el experto en la técnica basándose en la divulgación adicional en el presente documento, y por ejemplo comprenden polipéptidos de la invención que se han modificado químicamente para aumentar la semivida de los mismos (por ejemplo, por medio de pegilación); polipéptidos de la invención que comprenden al menos un sitio de unión adicional para la unión a una proteína sérica (tal como albúmina sérica); o polipéptidos de la invención que comprenden al menos un polipéptido usado en la invención que se liga a al menos un resto que aumenta la semivida del polipéptido de la invención.

Según un aspecto específico, preferido pero no limitativo de la invención, los polipéptidos usados en la invención pueden contener, además del uno o más V_{HH} dirigidos contra un epítipo en una célula diana, al menos un dominio variable único de inmunoglobulina contra albúmina sérica humana. Estos dominios variables únicos de inmunoglobulina contra albúmina sérica humana pueden ser tal como se describen generalmente en las solicitudes de Ablynx N.V. citadas en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento WO 04/062551). Algunos ISVD particularmente preferidos, tales como Nanobodies que proporcionan una semivida aumentada y que pueden usarse en los polipéptidos usados en la invención incluyen los ISVD, por ejemplo Nanobodies ALB-1 a ALB-10 descritos en el documento WO 06/122787 (véanse las tablas II y III) de los cuales ALB-8 (SEQ ID NO: 62 in el documento WO 06/122787) se prefiere particularmente, así como los ISVD, por ejemplo Nanobodies divulgados en el documento WO 2012/175400 (SEQ ID NO:1-11 del documento WO 2012/175400) y el ISVD, por ejemplo Nanobody con SEQ ID NO:109 divulgado en la solicitud provisional estadounidense en tramitación junto con la presente n.º 62/047.560 titulada "Improved immunoglobulin single variable domains" (fecha de presentación: 8 de septiembre de 2014; cesionario: Ablynx N.V.).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión (tal como se definen adicionalmente en el presente documento), en el que dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión aumentan la semivida del dímero (en comparación con el dímero que carece de dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión). Preferiblemente, dicho uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión que aumentan la semivida del dímero es un ISVD que aumenta la semivida del dímero.

En una realización, la invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho ISVD que aumenta la semivida del dímero se une a albúmina sérica, preferiblemente albúmina sérica humana, o inmunoglobulina sérica, preferiblemente, IgG humana.

En una realización, la invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, que tiene una semivida sérica que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo

al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida del dímero correspondiente sin dicho ISVD que aumenta la semivida del dímero.

5 En una realización, la invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, que tiene una semivida sérica que está aumentada en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas., o incluso más de 24, 48 ó 72 horas, en comparación con dicho ISVD correspondiente que aumenta la semivida del dímero.

10 En una realización, la invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, que tiene una semivida sérica en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más; por ejemplo, de al menos 5 días (tal como aproximadamente de 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como aproximadamente de 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como aproximadamente de 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente de 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente de 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente de 14 a 19 días).

15 En un aspecto particularmente preferido pero no limitativo de la invención, la invención usa un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), que es un V_{HH}; y que comprende además uno o más (preferiblemente uno) dominio variable único de inmunoglobulina de unión a albúmina sérica tal como se describe en el presente documento, por ejemplo el dominio variable único de inmunoglobulina de unión a albúmina sérica de Alb11, Alb23, Alb129, Alb132, Alb8, Alb11 (S112K)-A, Alb82, Alb82-A, Alb82-AA, Alb82-AAA, Alb82-G, Alb82-GG, Alb82-GGG (véase la tabla 10), por ejemplo elegido de SEQ ID NO: 32-44.

20 25 Tabla 10: Secuencias de ISVD de unión a albúmina sérica ("ID" se refiere a la SEQ ID NO tal como se usa en el presente documento)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Alb8	32	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
Alb23	33	EVQLLES GGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
Alb129	34	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
Alb132	35	EVQLVESGGGVVQPGGSLRSLCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
Alb11	36	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
Alb11 (S112K)-A	37	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVKVSSA
Alb82	38	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSS
Alb82-A	39	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
Alb82-AA	40	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSAA
Alb82-AAA	41	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSAAA
Alb82-G	42	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSG
Alb82-GG	43	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTYADS VKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGG

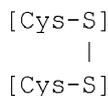
Alb82-GGG	44	EVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLVADS VKGRFTISRDNKTTLLYLQMNLSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGG
-----------	----	--

Los ISVD, tales como Nanobodies, comprenden puentes disulfuro internos (también conocidos como canónicos o intramoleculares), que están altamente conservados. La eliminación de estos puentes disulfuro internos específicos compromete la actividad de los ISVD.

5 Los presentes inventores observaron sorprendentemente que la oxidación del resto de tiol (-SH) de un residuo de cisteína no apareado (abreviado como Cys, cys o C; ácido 2-amino-3-sulfhidrilpropanoico; que es un α -aminoácido con la fórmula química $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$) ubicado en la extensión C-terminal, preferiblemente en el extremo C-terminal, de un primer polipéptido usado en la invención y el resto de tiol de un resto de cisteína no apareado ubicado en la extensión C-terminal, preferiblemente en el extremo C-terminal, de un segundo polipéptido usado en la invención dio como resultado un derivado de disulfuro cistina, produciéndose de ese modo dímeros, pero en los que no se hicieron reaccionar restos de tiol intramoleculares. Dicho de otro modo, los grupos tiol de las cisteínas ubicadas de manera C-terminal se oxidaron específicamente para formar enlaces intermoleculares, sin oxidación aberrante o reoxidación de los grupos tiol intramoleculares, manteniéndose así la integridad del ISVD, tal como se demuestra en la sección de ejemplos. El acoplamiento de los polipéptidos para dar un dímero se realizó mediante conjugación química, en la que los restos de tiol de la cisteína en la extensión C-terminal en cada uno de los dos polipéptidos se oxidaron para dar el derivado de disulfuro cistina. Preferiblemente, dicha cistina (por ejemplo, puente disulfuro) es el único enlace disulfuro intercatenario presente en el dímero, por ejemplo



en el que



indica derivado de disulfuro cistina;

-[Cys-S] y -[AA_x]-[Cys-S]-[AA_y] indica la extensión C-terminal que comprende una cisteína de dicho polipéptido;

"AA" representa cualquier aminoácido tal como se define en el presente documento;

el prefijo "N" representa el extremo N-terminal de un polipéptido;

el sufijo "C" representa el extremo C-terminal de un polipéptido;

los subíndices "x", "y", "p" y "q" representan un número, elegido independientemente de los enteros que oscilan desde 0-50, tal como que oscilan desde 1-40, o que oscilan desde 2-30 tal como, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20. Por ejemplo, si todos de "x", "y", "p" y "q" son 0, la extensión C-terminal es sólo la cisteína; y si tanto "y" como "q" son 0, pero "x" y "p" no son 0, el extremo C-terminal de la extensión C-terminal es cisteína.

La presente invención se refiere a un método para producir dímeros (de polipéptido), que comprende al menos las etapas de: (i) proporcionar un primer polipéptido, en el que dicho primer polipéptido comprende al menos un V_{HH} y una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal; (ii) proporcionar un segundo polipéptido, en el que dicho segundo polipéptido comprende al menos un V_{HH} y una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal; y (iii) oxidar el resto de tiol de dicho resto de cisteína en la extensión C-terminal, preferiblemente en el extremo C-terminal, de dicho primer polipéptido y el resto de tiol de dicho resto de cisteína en la extensión C-terminal, preferiblemente en el extremo C-terminal, de dicho segundo polipéptido a un derivado de disulfuro cistina; produciéndose de ese modo dichos dímeros; caracterizado porque se mantiene la integridad de los V_{HH} y dicho derivado de disulfuro cistina es el único enlace disulfuro intermolecular presente en el dímero.

La invención se refiere además a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido comprende al menos dos V_{HH} y/o dicho segundo polipéptido comprende al menos dos V_{HH}.

La invención se refiere además a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dichos al menos dos V_{HH} de dicho primer polipéptido son idénticos y/o dichos al menos dos V_{HH} de dicho segundo polipéptido son idénticos.

- 5 La invención se refiere además a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido son idénticos o son diferentes.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "dímero biespecífico" se refiere a un dímero en el que el primer polipéptido del dímero es diferente del segundo polipéptido del dímero, independientemente de la valencia (por ejemplo, monovalente, bivalente o multivalente) o especificidad (por ejemplo, monoespecífico, biespecífico o multiespecífico) de los polipéptidos primero y segundo. Se apreciará que un dímero puede comprender dos polipéptidos idénticos, pero biespecíficos.

15 Se proporcionan métodos para la generación de dímeros biespecíficos, por ejemplo el primer polipéptido es diferente del segundo polipéptido del dímero. En una primera realización, la cepa del huésped, por ejemplo la cepa de *Pichia* se transforma con dos vectores diferentes, en la que el primer vector codifica para el primer polipéptido y el segundo vector codifica para el segundo polipéptido. Alternativamente, se usa un vector, pero el vector comprende un primer gen que codifica para el primer polipéptido y un segundo gen que codifica para el segundo polipéptido. Alternativamente, se usan dos células huésped que expresan, cada una, uno u otro polipéptido tal como, por ejemplo, un primer vector que codifica para el primer polipéptido se expresa en una primera célula huésped, por ejemplo una célula de *Pichia* y un segundo vector que codifica para el segundo polipéptido se expresa en una segunda célula huésped, por ejemplo también de *Pichia*. El acoplamiento de los polipéptidos para dar un dímero biespecífico se realiza mediante conjugación química, por ejemplo en medios usados de *Pichia*, en los que las cisteínas (preferiblemente ubicadas de manera C-terminal) en la extensión C-terminal en cada uno de dichos dos polipéptidos se oxidan a un derivado de disulfuro cistina a través de sus restos de tiol a pH casi neutro tal como, por ejemplo, entre pH 6,5 y pH 7,5, por ejemplo pH 6,5, pH 6,6, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4 y pH 7,5.

25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para producir dímeros biespecíficos, que comprende al menos las etapas de:

- 30 (i) proporcionar un primer polipéptido, en el que dicho primer polipéptido comprende
- al menos un V_{HH} y
 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal;
- 35 (ii) proporcionar un segundo polipéptido, en el que dicho segundo polipéptido comprende
- al menos un V_{HH} y
 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal;
- 40 en el que dicho primer polipéptido es diferente de dicho segundo polipéptido; y
- 45 (iii) oxidar el resto de tiol de dicho resto de cisteína en el extremo C-terminal de dicho primer polipéptido y el resto de tiol de dicho resto de cisteína en el extremo C-terminal de dicho segundo polipéptido, opcionalmente mediante la adición de iones de cobre oxidantes (Cu^{2+}), a un pH de 6,5 a un pH de 7,5 a un derivado de disulfuro cistina; produciéndose de ese modo dichos dímeros,
- 50

caracterizado porque se mantiene la integridad de los V_{HH} y dicha cistina es el único enlace disulfuro intermolecular presente en el dímero.

55 El término "integridad", tal como se usa en el presente documento, se refiere al mantenimiento de la estructura, estabilidad y/o función de los ISVD tal como, por ejemplo, mantener los enlaces disulfuro intramoleculares apropiados que conectan las dos capas de estructuras de lámina β antiparalelas del dominio de inmunoglobulina, y unir su antígeno relacionado.

60 La presente invención se refiere a un método tal como se reivindica, en el que el gen que codifica para el primer polipéptido y el gen que codifica para el segundo polipéptido están presentes en dos vectores diferentes. Preferiblemente, dichos vectores están presentes en una célula huésped, por ejemplo *Pichia*. Alternativamente, dichos polipéptidos están codificados por diferentes genes que está ubicados en un vector.

65 El vector usado en la invención puede ser cualquier vector adecuado, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que

puede proporcionar expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula huésped, organismo huésped y/o sistema de expresión adecuado).

Los vectores usados en la invención pueden usarse para transformar una célula huésped u organismo huésped, es decir, para la expresión y/o producción del polipéptido usado en la invención. Los huéspedes o las células huésped adecuados estarán claros para el experto y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota (no humano) adecuado, por ejemplo:

- una cepa bacteriana, incluyendo pero sin limitarse a cepas gran-negativas tales como cepas de *Escherichia coli*; de *Proteus*, por ejemplo de *Proteus mirabilis*; de *Pseudomonas* por ejemplo de *Pseudomonas fluorescens*; y cepas gran-positivas tales como cepas de *Bacillus*, por ejemplo de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus brevis*; de *Streptomyces*, por ejemplo de *Streptomyces lividans*; de *Staphylococcus*, por ejemplo de *Staphylococcus carnosus*; y de *Lactococcus* por ejemplo de *Lactococcus lactis*;
- una célula fúngica, incluyendo pero sin limitarse a células de especies de *Trichoderma* por ejemplo de *Trichoderma reesei*; de *Neurospora* por ejemplo de *Neurospora crassa*; de *Sordaria* por ejemplo de *Sordaria macrospora*; de *Aspergilo*, por ejemplo de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus sojae*; o de otros hongos filamentosos;
- una célula de levadura, incluyendo pero sin limitarse a células de especies de *Saccharomyces* por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*; de *Schizosaccharomyces*, por ejemplo de *Schizosaccharomyces pombe*; de *Pichia* por ejemplo de *Pichia pastoris* o de *Pichia methanolica*; de *Hansenula*, por ejemplo de *Hansenula polymorpha*; de *Kluyveromyces*, por ejemplo de *Kluyveromyces lactis*; de *Arxula* por ejemplo de *Arxula adenivorans*; de *Yarrowia* por ejemplo de *Yarrowia lipolytica*;
- una célula o línea celular de anfibios, tal como ovocitos de *Xenopus*;
- una célula o línea celular derivada de insectos, tal como células/líneas celulares derivadas de lepidópteros, incluyendo, pero sin limitarse a células SF9 y Sf21 de *Spodoptera* o células/líneas celulares derivadas de *Drosophila* tales como células de Schneider y Kc;
- una planta o célula vegetal, por ejemplo en plantas de tabaco; y/o
- una célula o línea celular de mamífero, por ejemplo una célula o línea celular derivada de un humano, una célula o una línea celular de mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a, células CHO (por ejemplo, células CHO-K1), células BHK y células o líneas celulares humanas tales como células HeLa, COS, Caki y HEK293H;

así como todas las demás células huésped o huéspedes (no humanos) conocidos *per se* para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos de dominio (único) y fragmentos ScFv), que estarán claros para el experto. También se hace referencia a los antecedentes de la técnica generales citados anteriormente, así como a, por ejemplo, los documentos WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken *et al.* (Res. Immunol. 149: 589-99, 1998); Riechmann y Muyldermans (1999), citado anteriormente; van der Linden (J. Biotechnol. 80: 261-70, 2000); Joosten *et al.* (Microb. Cell Fact. 2:1, 2003); Joosten *et al.* (Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 384-92, 2005); y las referencias adicionales citadas en el presente documento.

En la presente descripción, un gen se define como la secuencia completa de ácido nucleico que es necesaria para la síntesis de un polipéptido funcional. Por tanto, el gen incluye más que los nucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos del polipéptido (región codificante) pero también todas las secuencias de ADN requeridas para la síntesis de un transcrito de ARN particular. Preferiblemente, la etapa (iii) se realiza en medio usado de *Pichia*.

Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para manipular ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, añadir, insertar, mutar, reemplazar o delecionar ácidos nucleicos en relación con el ácido nucleico que codifica para el ISVD. Se hace referencia a los manuales convencionales citados anteriormente.

Los presentes inventores proporcionan un protocolo optimizado adicional para producir dímeros biespecíficos, en el que la tasa de eficiencia fue mayor del 50%, tal como del 60%, el 70%, el 80% o incluso más del 90%, tal como $\geq 95\%$. Esto se logró uniendo un primer polipéptido reactivo a un portador (sólido) y haciendo fluir el segundo polipéptido reactivo sobre el primer polipéptido unido al portador. Cualquier cantidad de segundo polipéptido sin reaccionar puede regenerarse (reducirse) y hacerse fluir de nuevo sobre el primer polipéptido unido al portador. Esta etapa puede repetirse hasta que reaccione la totalidad de los polipéptidos primero y/o segundo.

En la etapa 1, el primer polipéptido se reduce para obtener material monomérico, preferiblemente material 100% monomérico. Las condiciones genéricas para reducir las disoluciones de polipéptidos típicas se exponen en el presente documento.

En la etapa 2, el primer polipéptido en un tampón se une en condiciones reductoras al portador. Un portador es preferiblemente una resina de cromatografía. Preferiblemente, el portador se une sólo al primer polipéptido, pero no al segundo polipéptido. Para evitar la posible formación de homodímeros del primer polipéptido, mientras se inmoviliza, el primer polipéptido puede inmovilizarse a baja densidad al portador. Tal separación espacial de los primeros polipéptidos individuales puede lograrse cargando el portador usando condiciones de unión subóptimas (por ejemplo, una velocidad de flujo demasiado alta para una resina de afinidad típica) o mediante cromatografía de lecho expandido. Los métodos y las condiciones para separar espacialmente los polipéptidos individuales en el portador pertenecen al conocimiento general común o pueden lograrse con experimentación rutinaria por parte del experto en la técnica. En una realización preferida, el portador sólo se une al primer polipéptido pero no al segundo polipéptido. Por ejemplo, puede usarse un portador tal como proteína A si el primer polipéptido (y preferiblemente no el segundo polipéptido) se une a la proteína A. Alternativamente, en caso de que tanto el primer polipéptido como el segundo polipéptido se unan al portador, entonces el portador, después de inmovilizar el primer polipéptido, se satura con un polipéptido de simulación, tal como un Nanobody extendido sin cisteína antes de aplicar el segundo polipéptido.

En la etapa 3, el exceso del segundo polipéptido, también en forma reducida (véase anteriormente), se aplica en un tampón y se hace circular por la columna (opcionalmente en condiciones ligeramente oxidantes). El segundo polipéptido se hace pasar sobre el portador hasta que el primer polipéptido inmovilizado se compleja por completo (conjuga) con el segundo polipéptido a través de un enlace disulfuro. Preferiblemente, esto se sigue midiendo la disminución de concentración del segundo polipéptido para que coincida con una población de primer polipéptido saturada. Si es necesario, para esta etapa, las condiciones se optimizan para limitar la cantidad de formación de un dímero monoespecífico de los segundos polipéptidos, tal como conoce bien el experto en la técnica. La población del segundo polipéptido que no está unido al portador puede recuperarse y usarse en futuras reacciones de acoplamiento, tal como por ejemplo reducirse de nuevo y aplicarse a la columna con el primer polipéptido hasta que el primer polipéptido esté saturado.

En la etapa 4, el dímero biespecífico se recupera del portador mediante condiciones de elución típicas para el portador usado, tal como conoce bien el experto en la técnica (por ejemplo, condiciones ácidas para la proteína A).

En el presente contexto, el término “inmovilización” se refiere a una molécula cuyo movimiento en el espacio se ha restringido o bien por completo o bien a una pequeña región limitada mediante la unión a una estructura sólida, por ejemplo el portador. En general, el término inmovilización se refiere al acto de limitar el movimiento o hacer que sea incapaz de moverse, por ejemplo retardar el movimiento. Los dímeros de la invención pueden inmovilizarse mediante cualquier método adecuado tal como, por ejemplo, mediante adsorción, unión covalente, atrapamiento, encapsulación y reticulación (reversible), preferiblemente unión covalente, más preferiblemente por afinidad. Puede usarse cualquier portador adecuado para la inmovilización. El experto en la técnica apreciará que la idoneidad de un portador depende del método de inmovilización. Por ejemplo, portadores para unión covalente son agarosa, celulosa, dextrano reticulado, poliestireno, geles de poliacrilamida y geles de sílice porosos. Un portador preferido es la resina de proteína A.

Los tampones adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, tampones acetato, tampones fosfato, tampones citrato, tampones sulfato, tampones glicina, tampones carboxilato y/o tampones Tris.

Las condiciones reductoras y oxidantes se conocen bien en la técnica. Se hace referencia a la sección de ejemplos, la descripción y, por ejemplo, manuales de química convencionales, tales como Principles of Modern Chemistry (2011 de Oxtoby, Gillis y Campion, 7ª edición). Las condiciones reductoras preferidas se realizan en DTT 1-15 mM, tal como 2-12 mM, 4-11 mM, 5-10 mM, preferiblemente 10 mM durante 1 h como mínimo (hasta 8 h como máximo) a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C, a una concentración de hasta 10 mg/ml de polipéptido, para permanecer el -SS- canónico oxidado. Las condiciones de oxidación preferidas se realizan en CuSO₄ 0,1-10 mM, 0,5-5 mM, preferiblemente 1 mM durante 1-4 h, preferiblemente 2 h a temperatura ambiente, o usando una par redox conveniente, lo que puede determinar fácilmente el experto en la técnica.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método tal como se reivindica para producir dímeros biespecíficos, que comprende al menos las etapas de:

1. proporcionar un primer polipéptido, en el que dicho primer polipéptido comprende
 - al menos un V_{HH} y
 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal;
2. reducir dicho primer polipéptido;
3. unir el primer polipéptido reducido de la etapa 2 en condiciones reductoras a un portador;
4. proporcionar un segundo polipéptido, en el que dicho segundo polipéptido comprende

- al menos un V_{HH};
 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal; en el que dicho primer polipéptido es diferente de dicho segundo polipéptido;
- 5
5. reducir dicho segundo polipéptido;
 6. aplicar el segundo polipéptido reducido de la etapa 5 al primer polipéptido reducido unido al portador de la etapa 3, opcionalmente en condiciones ligeramente oxidantes, oxidar el resto de tiol de dicho resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal, de dicho primer polipéptido y el resto de tiol de dicho resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal, de dicho segundo polipéptido a un derivado de disulfuro cistina; produciéndose de ese modo dichos dímeros biespecíficos; opcionalmente hasta que la totalidad del primero polipéptido esté conjugados por completo con el segundo polipéptido a través de un enlace disulfuro;
 7. opcionalmente, los segundos polipéptidos no conjugados se recuperan, reducen y aplican de nuevo según las etapas 5 y 6;
 8. eluir el dímero biespecífico del portador.
- 10
- 15
- 20

La invención se refiere además a cualquier método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende una extensión N-terminal.

25 La invención se refiere además a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende una extensión C-terminal de 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 residuo(s) de aminoácido que comprende(n) un resto de cisteína, preferiblemente en el extremo C-terminal.

30 La invención se refiere además a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicha extensión C-terminal se elige del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-15, preferiblemente dicha extensión C-terminal consiste en GlyGlyGlyCys (SEQ ID NO: 4), GlyGlyCys (SEQ ID NO: 3), GlyCys (SEQ ID NO: 2) o Cys (SEQ ID NO:1).

35 La invención se refiere además a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicha extensión C-terminal se fusiona genéticamente con el extremo C-terminal del ISVD ubicado de la manera más C-terminal en dicho polipéptido.

40 En una realización, el proceso de oxidación se optimiza añadiendo iones de cobre oxidantes (Cu²⁺), por ejemplo en forma de CuSO₄. Se observó que casi el 100% de los restos de tiol ubicados de manera C-terminal se oxidaron después del tratamiento con cobre. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que al menos el 80%, tal como el 85%, el 90%, el 95%, el 99% o incluso más del 99% tal como el 100% de dicho primero y/o dicho segundo polipéptido está dimerizado. El grado de oxidación puede determinarse mediante cualquier método adecuado, pero se determina preferiblemente mediante espectrometría de masas.

45 En una realización adicional, los dímeros se purifican hasta homogeneidad. La purificación puede lograrse mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica, tal como cromatografía, preferiblemente cromatografía de exclusión molecular, con la cual el experto en la técnica está bastante familiarizado. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, que comprende además la etapa de purificar dichos dímeros, opcionalmente mediante cromatografía de exclusión molecular. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dichos dímeros se purifican hasta al menos el 90% de pureza o más, por ejemplo el 95% de pureza o más, tal como el 97%, el 98%, el 99% o incluso el 100%. La pureza puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, y se determina preferiblemente mediante espectrometría de masas.

50

55 En una realización, la presente invención se refiere a un dímero, que puede prepararse mediante un método tal como se describió anteriormente.

60 Los presentes inventores observaron sorprendentemente que la unión y otras características funcionales, tales como potencia, de los polipéptidos en el dímero no sólo se conservaron, sino que incluso se mejoraron en comparación con la referencia correspondiente.

65 Sin limitarse a ninguna teoría, se planteó la hipótesis de que el parátipo de los ISVD puede estar en una posición más "favorable" para el reconocimiento de antígenos en este ensamblaje de dímero que en el ensamblaje de referencia correspondiente.

Tal como se usa en el presente documento, se usa una "referencia" como punto de referencia para evaluar el

rendimiento, tal como una o más características funcionales de una molécula, tales como, por ejemplo, afinidad, eficacia y potencia tal como se describe en el presente documento. El dímero particular determinará la idoneidad de una determinada referencia, que puede que lo evalúe fácilmente un experto en la técnica. Preferiblemente, la referencia consistirá en el mismo número y/o los mismos ISVD que el número y/o identidad de los ISVD del dímero. Preferiblemente, las referencias comprenden los mismos polipéptidos que componen el dímero, pero en la referencia estos polipéptidos se forman mediante fusión genética en lugar de conjugación química tal como se describe en el presente documento (véase, por ejemplo, la sección de ejemplos). Una comparación entre un dímero y uno o ambos polipéptidos que componen individualmente el dímero ya proporciona información significativa sobre el rendimiento del dímero.

Los dímeros de la invención son tal como se definen por las reivindicaciones y comprenden un primer polipéptido que comprende al menos un V_{HH} y un segundo polipéptido que comprende al menos un V_{HH} . La afinidad del dímero puede determinarse como un todo, por ejemplo de ambos polipéptidos conjuntamente, o la afinidad del dímero puede determinarse determinando la afinidad de cada polipéptido que constituye el dímero individualmente. Dicho de otro modo, en este último caso la afinidad se determina para un polipéptido, independiente de los efectos de avidéz debidos al otro polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "potencia" es una medida de un agente, tal como un dímero, una referencia, un polipéptido, ISVD o Nanobody, su actividad biológica. La potencia de un agente puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica tal como, por ejemplo, según se describe en la sección de ejemplos. Los ensayos de potencia basados en cultivo celular suelen ser el formato preferido para determinar la actividad biológica, puesto que miden la respuesta fisiológica provocada por el agente y pueden generar resultados en un periodo de tiempo relativamente corto. Pueden usarse diversos tipos de ensayos basados en células, basados en el mecanismo de acción del producto incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos de proliferación, ensayos de citotoxicidad, ensayos de genes indicadores, ensayos de unión a receptores de superficie celular y ensayos para medir la inducción/inhibición de proteína esencial funcionalmente u otra molécula señal (tal como proteínas fosforiladas, enzimas, citocinas, AMPc y similares), todos bien conocidos en la técnica. Los resultados de los ensayos de potencia basados en células pueden expresarse como "potencia relativa" según se determina mediante comparación del dímero de la invención con la respuesta obtenida para la referencia correspondiente (véase la sección de ejemplos).

Se dice que un compuesto, por ejemplo el dímero de la invención, es más potente que una referencia, por ejemplo el compuesto de referencia, tal como un constructo que comprende los polipéptidos correspondientes, cuando la respuesta obtenida para el compuesto, por ejemplo el dímero de la invención es al menos 1,5 veces, tal como 2 veces, pero preferiblemente al menos 3 veces, tal como al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 75 veces e incluso más, preferiblemente incluso al menos 100 veces o más (por ejemplo funcionalmente mejor) que la respuesta del compuesto de referencia, por ejemplo la referencia correspondiente en un ensayo dado.

La eficacia o potencia de los dímeros de la invención, y de las composiciones que comprenden los mismos, puede someterse a prueba usando cualquier ensayo *in vitro*, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o trastorno específico implicado. Los ensayos y modelos animales adecuados estarán claros para el experto y, por ejemplo, incluirán ensayos de desplazamiento de ligando (por ejemplo, Burgess *et al.*, Cancer Res 2006 66:1721-9), ensayos de dimerización (por ejemplo, el documento WO2009/007427A2, Goetsch, 2009), ensayos de señalización (por ejemplo, Burgess *et al.*, Mol Cancer Ther 9: 400-9), ensayos de proliferación/supervivencia (por ejemplo, Pacchiana *et al.*, J Biol Chem sep. de 2010 M110.134031), ensayos de adhesión celular (por ejemplo, Holt *et al.*, Haematologica 2005 90: 479-88) y ensayos de migración (por ejemplo, Kong-Beltran *et al.*, Cancer Cell 6: 75-84), ensayos de germinación de células endoteliales (por ejemplo, Wang *et al.*, J Immunol. 2009; 183: 3204-11) y modelos de xenoinjerto *in vivo* (por ejemplo, Jin *et al.*, Cancer Res. 2008 68: 4360-8), así como los ensayos y modelos animales usados en la parte experimental a continuación y en la técnica anterior citada en el presente documento. Un medio para expresar la inhibición de dicha primera diana *in vitro* es mediante CI_{50} .

En particular, los dímeros de la invención se unen a una diana con una afinidad (medida adecuadamente y/o expresada como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_{on} y/o a velocidad k_{off} mejor que la de la referencia.

En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones que comprende polipéptidos tal como se describen en el presente documento, en el que dicho dímero se une a una diana con una CI_{50} que es al menos el 10%, tal como el 20%, el 30%, el 50%, el 80%, el 90%, o incluso el 100% mejor o más que la CI_{50} de una referencia, por ejemplo tal como se determina en un ensayo de competencia de ligando, FACS de competencia, un ensayo celular funcional, tal como inhibición de quimiotaxia inducida por ligando, un ensayo ALPHASCREEN®, etc., preferiblemente mediante una FACS de competencia.

En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones que comprende polipéptidos tal como se describen en el presente documento, en el que dicho dímero se une a una diana

con una Cl_{50} que es al menos 1,5 veces, tal como 2 veces, 3 veces o 4 veces, e incluso 5 veces o 10 veces mejor que la Cl_{50} de una referencia, por ejemplo tal como se determina en un ensayo de competencia de ligando, FACS de competencia, un ensayo celular funcional, tal como inhibición de quimiotaxia inducida por ligando, un ensayo ALPHASCREEN®, etc., preferiblemente mediante una FACS de competencia.

En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones que comprende polipéptidos tal como se describen en el presente documento, que tiene una Cl_{50} de entre 200 nM y 0,01 nM, tal como 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 ó 200 nM, por ejemplo determinado en un ensayo de competencia de ligando, FACS de competencia, un ensayo celular funcional, tales como inhibición de quimiotaxia inducida por ligando, un ensayo ALPHASCREEN®, etc.

Los procesos de transporte, fabricación, almacenamiento y entrega pueden ejercer múltiples tensiones sobre los polipéptidos, tales como tensiones químicas y físicas. Durante el almacenamiento pueden producirse modificaciones químicas tales como, por ejemplo, desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, isomerización, beta-eliminación o intercambio de disulfuro. La tensión física puede provocar desnaturalización y desplegamiento, agregación, formación de partículas, precipitación, opalescencia o adsorción. Se sabe que estas tensiones pueden afectar la integridad fisicoquímica de las proteínas terapéuticas, por ejemplo productos terapéuticos de anticuerpos.

Tal como se indicó anteriormente, los inventores observaron que los dímeros de la invención tienen características funcionales y de unión favorables inesperadas. Estas características también se conservaron durante periodos prolongados de tiempo, sin ninguna pérdida aparente o sustancial de potencia. Esto hace que los dímeros sean útiles para el almacenamiento y el transporte. La invención proporciona dímeros estables de la invención. "Estable" significa generalmente que los dímeros no experimentan cambios físicos o químicos significativos, en particular oxidación, tras el almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo, por ejemplo de 1 mes a 36 meses, aunque esté expuesto a una o más tensiones químicas o físicas, tales como temperaturas elevadas (iguales a o mayores de + 25°C), o tensión física, tal como agitación o sacudidas. Más en particular, "estable" significa que tras el almacenamiento durante periodos prolongados (tal como se definen) en condiciones (tal como se definen) sólo hay una formación limitada de uno o más productos de degradación, por ejemplo derivados de bajo peso molecular (LMW) (por ejemplo, polipéptidos) de los dímeros de la invención; y/o derivados de alto peso molecular (HMW) (oligómeros o polímeros) formados, por ejemplo, mediante agregación de los dímeros.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho dímero es estable durante al menos 2 meses, tal como 4 meses, 6 meses, 12 meses o incluso más, tal como 18 meses, 24 meses o 36 meses. a -20°C, +4°C, temperatura ambiente, por ejemplo +20°C o incluso a +25°C, en el que dicha estabilidad se caracteriza por una formación limitada o la ausencia de formación de LMW y/o HMW, por ejemplo menos del 10%, tal como menos del 5%, menos del 2% o incluso LMW y/o HMW no detectables.

Las técnicas generales que pueden usarse para evaluar la estabilidad de una proteína incluyen dispersión estática de luz, filtración de flujo tangencial, espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier, dicroísmo circular, desplegamiento de proteínas inducido por urea, fluorescencia intrínseca de triptófano y/o unión a proteínas de ácido 1-anilino-β8-naftalenosulfónico. Estas técnicas también son aplicables a los dímeros de la invención. Además, los dímeros de la invención muestran poca o ninguna pérdida de potencia/actividad biológica en el transcurso del almacenamiento y/o bajo la influencia de una o más tensiones tal como se definen en el presente documento.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para almacenar polipéptidos que comprenden restos de cisteína reactivos, que comprende al menos la etapa de oxidar el resto de tiol de dicho resto de cisteína reactivo al derivado de disulfuro cistina, inactivando temporalmente de ese modo dichos restos de cisteína reactivos, en el que dichos polipéptidos comprenden además enlaces de cistina (internos).

A pesar de las propiedades funcionales favorables de los dímeros de la invención, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que los dímeros podrían ser particularmente adecuados como reserva para uso instantáneo tal como, por ejemplo, el acoplamiento de grupos funcionales usando la cisteína C-terminal, por ejemplo mediante la química de la maleimida. Se desarrolló un protocolo con condiciones reductoras suaves, en el que el puente disulfuro intermolecular del dímero se redujo para activar el grupo tiol de los polipéptidos constituyentes. Las condiciones optimizadas dieron como resultado la reducción del disulfuro que forma el dímero sin reducir los puentes disulfuro de ISVD canónicos internos.

Los reductores preferidos son los reductores basados en ácido, tales como ácido oxálico ($C_2H_2O_4$), ácido fórmico ($HCOOH$), ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), ácido fosforoso o β-mercaptoetanol, hidruro de litio y aluminio ($LiAlH_4$), hidrógeno naciente (atómico), amalgama de sodio, diborano, borohidruro de sodio ($NaBH_4$), compuestos que contienen el ion Sn^{2+} , tales como cloruro de estaño (II), compuestos de sulfito, hidrazina, amalgama de zinc-mercurio ($Zn(Hg)$), hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H), catalizador de Lindlar, fosfitos, hipofosfitos, compuestos que contienen Fe^{2+} , tales como sulfato de hierro (II), monóxido de carbono (CO), carbono (C), ditiotreitól (DTT) y tri (2-carboxietil)fosfina HCl (TCEP), preferiblemente DTT y TCEP.

Las concentraciones finales preferidas de los reductores son de entre 50 mM y 1 mM, tal como entre 40 mM y 2 mM, entre 30 mM y 5 mM, y 20 mM y 7,5 mM, preferiblemente 10 mM.

Se determinó que un tratamiento durante la noche con DTT 10 mM a 4°C (o durante al menos 2 h a temperatura ambiente) era muy adecuado para reducir el enlace disulfuro intermolecular de los ISVD a concentraciones de hasta 10 mg/ml, pero sin afectar a los enlaces disulfuro canónicos internos. La reducción puede llevarse a cabo preferiblemente usando DTT o TCEP. A diferencia de TCEP, DTT se retira preferiblemente para crear condiciones de acoplamiento óptimas. Los polipéptidos monoméricos de cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés) pueden separarse del dímero no reducido y DTT.

La extensión de la reducción puede controlarse a través de cualquier medio conocido en la técnica, tal como por ejemplo a través de SEC o SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método tal como se define mediante las reivindicaciones, que comprende además la etapa de reducir dicha cistina (C-terminal) de dicho dímero, preferiblemente en condiciones en las que los enlaces disulfuro internos de dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido permanecen oxidados.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para generar polipéptidos que comprenden restos de cisteína reactivos, que comprende al menos las etapas de:

(i) proporcionar polipéptidos según la invención, que se dimerizan a través de una cistina (enlace disulfuro; enlace SS o puente disulfuro entre dos cisteínas);

(ii) reducir dicha cistina;

generándose de ese modo polipéptidos que comprenden restos de cisteína reactivos; preferiblemente dicho enlace de cistina está ubicado en el extremo C-terminal de dichos polipéptidos. Preferiblemente, las condiciones reductoras de dicha etapa (ii) se eligen de tal manera que los enlaces de cistina internos no se reduzcan.

Después de la reducción de los dímeros, los polipéptidos monoméricos reducidos se usan preferiblemente de inmediato, por ejemplo en un plazo de 0,5 h pero preferiblemente en un plazo de 10 minutos, para la conjugación o se congelan para impedir la reoxidación, aunque la reoxidación no se impide por completo mediante congelación. La evidencia experimental sugiere que los polipéptidos monoméricos reducidos de la divulgación son estables hasta 24 h a 4°C en D-PBS.

En una realización, los dímeros y los polipéptidos constituyentes usados en la invención comprenden uno o más grupos funcionales, residuos o restos. En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, que comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión. En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende además uno o más de otros grupos, residuos, restos o unidades de unión. Por ejemplo, los grupos funcionales, residuos o restos pueden acoplarse o ligarse al resto de tiol (reactivo) del residuo de cisteína en el extremo C-terminal del polipéptido y/o los grupos funcionales, residuos o restos pueden acoplarse o ligarse al extremo N-terminal del polipéptido usado en la invención. En una realización, uno o ambos extremos N-terminales del dímero de la invención comprenden grupos funcionales, residuos o restos.

Los ejemplos de tales grupos, residuos o restos y métodos y técnicas que pueden usarse para unir tales grupos, residuos o restos y los usos y las ventajas potenciales de tales grupos, residuos o restos estarán claros para el experto. Sin ser limitativos, los grupos reactivos con tiol para la modificación de anticuerpos incluyen los grupos maleimida, vinilsulfona, haloacetilo o disulfuro de piridilo. Las maleimidias reaccionan selectivamente con cisteínas a pH neutro, aunque hay reactividad con grupos de amina a mayores valores de pH. Se genera un enlace tioéter estable.

Pueden unirse uno o más grupos funcionales, residuos o restos al dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas al dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención. Los ejemplos de tales grupos funcionales, residuos o restos estarán claros para el experto. Por ejemplo, tales uno o más grupos funcionales, residuos o restos pueden aumentar la semivida, la solubilidad y/o la absorción del dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención, tales uno o más grupos funcionales, residuos o restos pueden reducir la inmunogenicidad y/o la toxicidad del dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención, tales uno o más grupos funcionales, residuos o restos pueden eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseado del dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención, y/o tales uno o más grupos funcionales, residuos o restos pueden conferir otras propiedades ventajosas y/o reducir las propiedades no deseadas del dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención; o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. Los ejemplos de tales grupos funcionales, residuos o restos y de técnicas para introducirlos estarán claros para el experto, y generalmente pueden comprender todos los grupos funcionales, residuos o restos y técnicas mencionados en los antecedentes de la técnica generales citados en el presente documento, así como los grupos funcionales, residuos o restos y técnicas conocidos *per se* para la modificación de proteínas farmacéuticas, y en

particular para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (incluyendo ScFv y anticuerpos de dominio único), para los cuales se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980).

5 En vista de la especificidad, los dímeros de la invención y/o polipéptidos usados en la invención también son muy adecuados para la conjugación con agentes de formación de imágenes. Los agentes de formación de imágenes adecuados para conjugarse a anticuerpos se conocen bien en la técnica y son igualmente útiles para conjugarse con los dímeros de la invención y/o polipéptidos usados en la presente invención. Los agentes de formación de imágenes adecuados incluyen, pero no se limitan a, moléculas seleccionadas preferiblemente del grupo que consiste en
10 moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos de metal, metales, coloidal oro, marcador fluorescente, marcador metálico, biotina, material quimioluminiscente, bioluminiscente, cromóforo y mezclas de los mismos.

15 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención, que comprende además un agente de formación de imágenes que incluye, pero no se limita a una molécula seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos de metal, metales, oro coloidal, marcador fluorescente,
20 marcador metálico, biotina, material quimioluminiscente, bioluminiscente, cromóforo y mezclas de los mismos.

Uno o más marcadores detectables u otros grupos generadores de señales, residuos o restos pueden acoplarse al dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención, dependiendo del uso pretendido del polipéptido marcado. Los marcadores y las técnicas adecuadas para unirlos, usarlos y detectarlos estarán claros para el experto y, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, los marcadores fluorescentes, marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, radioisótopos, metales, quelatos de metal, cationes de metal, cromóforos y enzimas, tales como los mencionados en la página 109 del documento WO 08/020079. Los radioisótopos y radionúclidos conocidos en la técnica por su utilidad como agentes de detección incluyen, pero no se limitan a, ³H
25 ¹⁴C ¹⁵N ¹⁸F ³⁵S ⁶⁴Cu ⁶⁷Cu ⁷⁵Br ⁷⁶Br ⁷⁷Br ⁸⁹Zr ⁹⁰Y ⁹⁷Ru ⁹⁹Tc ¹⁰⁵Rh ¹⁰⁹Pd ¹¹¹In ¹²³I ¹²⁴I ¹²⁵I ¹³¹I ¹⁴⁹Pm ¹⁵³Sm ¹⁶⁶Ho ¹⁷⁷Lu ¹⁸⁶Re ¹⁸⁸Re ¹⁹⁸Au ¹⁹⁹Au ²⁰³Pb ²¹¹A ²¹²Pb ²¹²Bi ²¹³Bi ²²³Ra ²²⁵Ac. Indio¹¹¹ se prefiere particularmente como radionúclido de diagnóstico porque: puede administrarse entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mCi de forma segura sin toxicidad detectable; y los datos de formación de imágenes son predictivos generalmente de la distribución de CPF posterior (véase más adelante). Véanse, por ejemplo, Murray J. L., 26 J. Nuc. Med. 3328 (1985) y Carraguiño, J. A. et al., 26 J. Nuc. Med. 67 (1985).

35 Otras marcadores adecuados estarán claros para el experto y, por ejemplo, incluyen restos que pueden detectarse usando espectroscopía de RMN o ESR. Por ejemplo, los polipéptidos usados en la invención pueden radiomarcarse con ⁸⁹Zr tal como se ejemplifica en la sección de Ejemplos. Tales polipéptidos marcados usados en la invención pueden usarse, por ejemplo, para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluyendo inmunoensayos conocidos *per se*, tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de tipo sándwich", etc.) así como con propósitos de diagnóstico y formación de imágenes *in vivo*, según la elección del marcador específico. En una realización preferida, los polipéptidos radiomarcados usados en y/o dímeros de la invención se detectan mediante formación de imágenes a través de microPET. Las imágenes pueden reconstruirse usando el software AMIDE Medical Image Data Examiner (versión 1.0.4, Universidad de Stanford).

45 Puede unirse un grupo funcional, residuo o resto que es una parte de un par de unión específica, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Tal grupo funcional puede usarse para ligar el dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de unión, es decir, mediante la formación del par de unión. Por ejemplo, un dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención puede conjugarse con biotina y ligarse a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, dicho dímero y/o polipéptido conjugado puede usarse como indicador, por ejemplo en un sistema de diagnóstico en el que un agente productor de señales detectables se conjuga con avidina o estreptavidina. Tales pares de unión también pueden usarse, por ejemplo, para unir el dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención a un portador, incluyendo portadores adecuados con propósitos farmacéuticos. Un ejemplo no limitativo son las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh 2000 (Journal of Drug Targeting 8 (4): 257) Tales pares de unión también pueden usarse para ligar un agente terapéuticamente activo al polipéptido de la invención.

60 Otras modificaciones químicas y enzimáticas potenciales estarán claras para el experto. Tales modificaciones también pueden introducirse con propósitos de investigación (por ejemplo, para estudiar relaciones función-actividad). Por ejemplo, se hace referencia a Lundblad y Bradshaw 1997 (Biotechnol. Appl. Biochem. 26:143-151).

En algunas realizaciones, los dímeros de la invención y/o polipéptidos usados en la invención se conjugan con fármacos para formar conjugados dímero/polipéptido-fármaco (abreviados colectivamente como "CPF" en el presente documento). Los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) contemporáneos se usan en aplicaciones oncológicas, en las que el uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de fármacos, tales como agentes citotóxicos

o citostáticos, toxinas o restos de toxina, permite la administración dirigida del resto de fármaco a tumores, lo que puede permitir una mayor eficacia, menor toxicidad, etc. Estos CAF tienen tres componentes: (1) un anticuerpo monoclonal conjugado a través de un (2) ligador a un (3) resto de fármaco, tal como un resto de toxina o una toxina. Se proporciona una descripción general de esta tecnología en Ducry *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 21: 5-13 (2010), Carter *et al.*, *Cancer J.* 14 (3):154 (2008) y Senter, *Current Opin. Chem Biol.* 13:235-244 (2009). Los CPF de la presente invención también tienen tres componentes: (1) un dímero conjugado a través de un (2) ligador a un (3) fármaco, tal como un resto de toxina o una toxina. Tal como se indicó anteriormente, aunque la conjugación de ligadores y fármacos tiene un efecto mayor y desfavorable sobre el perfil de agregación, biodistribución y PK de fragmentos de anticuerpo, tales como el polipéptido de la invención, que el anticuerpo de mayor tamaño, el experto en la técnica apreciará que la tecnología, los métodos, medios, etc. de los CAF son en general aplicables igualmente a los CPF (remítase a Feng *et al.* citado anteriormente).

La invención proporciona polipéptidos usados en la invención comprendidos en el dímero de la invención que comprende un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina. En aras de la exhaustividad, la invención proporciona un dímero de la invención que comprende un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina.

La fármaco, por ejemplo el resto de toxina o la toxina puede ligarse o conjugarse con el dímero y/o polipéptido usando cualquier método adecuado. Generalmente, la conjugación se realiza mediante unión covalente al dímero y/o polipéptido, tal como se conoce en la técnica, y generalmente se basa en un ligador, a menudo un enlace peptídico. Por ejemplo, el fármaco, tal como un resto de toxina o una toxina, puede unirse covalentemente al polipéptido directamente o a través de un ligador adecuado. Los ligadores adecuados pueden incluir ligadores no escindibles o escindibles, por ejemplo, ligadores escindibles por pH que comprenden un sitio de escisión para una enzima celular (por ejemplo, esterasas celulares, proteasas celulares tales como catepsina B, véase, por ejemplo, la sección de ejemplos). Tales ligadores escindibles pueden usarse para preparar un ligando que puede liberar un fármaco, tal como un resto de toxina o una toxina después de que el polipéptido se internaliza. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, el número de restos de fármaco por dímero y/o polipéptido puede cambiar, dependiendo de las condiciones de reacción, y puede variar desde 1:1 hasta 20:1 de fármaco: polipéptido (también indicado como razón fármaco - anticuerpo o RFA). Tal como apreciarán también los expertos en la técnica, el número real es un promedio, cuando la reacción y/o purificación no se controla de manera estricta. Preferiblemente, el dímero de la invención comprende además un fármaco, en el que la razón de fármaco con respecto a dímero (RFA) es de 1. Puede usarse una variedad de métodos para ligar o conjugarse un fármaco, tal como un resto de toxina o una toxina, a un dímero y/o polipéptido. El método particular seleccionado dependerá del fármaco, tal como un resto de toxina o una toxina, y del dímero y/o polipéptido que va a ligarse o conjugarse. Si se desea, pueden usarse ligadores que contienen grupos funcionales terminales para ligar el dímero y/o el polipéptido y el fármaco, por ejemplo un resto de toxina o una toxina. En general, la conjugación se logra haciendo reaccionar el fármaco, por ejemplo un resto de toxina o una toxina, que contiene un grupo funcional reactivo (o se modifica para que contenga un grupo funcional reactivo) con un ligador o directamente con un dímero y/o polipéptido. Los enlaces covalentes formados haciendo reaccionar un fármaco, por ejemplo un resto de toxina o una toxina que contiene (o se modifica para que contenga) un resto químico o grupo funcional que puede reaccionar, en condiciones apropiadas, con un segundo grupo químico formando de ese modo un enlace covalente. Si se desea, puede añadirse un grupo químico reactivo adecuado al polipéptido o a un ligador usando cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). En la técnica se conocen muchas combinaciones de grupos químicos reactivos adecuados, por ejemplo, un grupo de amina puede reaccionar con un grupo electrófilo tal como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), éster de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) y similares. Los tioles pueden reaccionar con maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfuros de piridilo, tiol del ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol), y similares. Un grupo funcional aldehído puede acoplarse a moléculas que contienen amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo de fósforo trivalente para formar uniones fosforamido o fosforimida. Los métodos adecuados para introducir grupos de activación en moléculas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, citado anteriormente).

Tal como se muestra en los ejemplos, se encontró inesperadamente que los polipéptidos de la presente invención que comprenden una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína en el extremo C-terminal eran notablemente adecuados para la conjugación de manera muy controlada de un número específico de fármacos por polipéptido, por ejemplo RFA de 1. Esto da como resultado un mejor perfil de eficacia y seguridad controlado en comparación con las moléculas de la técnica anterior. Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos tal como se reivindican que comprenden un único fármaco conjugado, por ejemplo RFA = 1. El procedimiento de la invención permite así que se produzcan dímeros con una homogeneidad mejorada.

Tal como se describe a continuación, el fármaco del CPF puede ser cualquier número de agentes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes citostáticos, agentes citotóxicos tales como agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina activa enzimáticamente de bacterias, hongos y plantas, o de origen animal, o fragmentos de la misma), se proporcionan restos de toxina, o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). En otras realizaciones, la divulgación proporciona además métodos de uso de los CPF. La presente divulgación también se refiere a radioinmunoterapia (RIT), en la que un polipéptido usado en o dímero de la invención se marca con un isótopo radiactivo para administrar radiación citotóxica a una célula diana.

Los fármacos para su uso en la presente invención incluyen fármacos citotóxicos, particularmente aquellos que se

usan para terapia contra el cáncer. Tales fármacos incluyen, en general, agentes que dañan el ADN, antimetabolitos, productos naturales y sus análogos. Las clases a modo de ejemplo de agentes citotóxicos incluyen los inhibidores enzimáticos tales como los inhibidores de dihidrofolato reductasa y los inhibidores de timidilato sintasa, intercaladores de ADN, agentes de escisión de ADN, inhibidores de topoisomerasas, la familia de fármacos de antraciclinas, los fármacos de la vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos de pteridinas, diinenos, las podofilotoxinas, dolastatinas, maitansinoides, inductores de diferenciación y taxoles.

Los miembros de estas clases incluyen, por ejemplo, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptapurina, arabinósido de citosina, melfalán, leurosina, leurosideína, actinomomicina, daunorubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, caminomina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina y derivados de podofilotoxina tales como etopósido o fosfato de etopósido, vinblastina, vincristina, vindesina, taxanos incluyendo taxol, taxotere, ácido retinoico, ácido butírico, N8-acetil-espermidina, camptotecina, caliqueamicina, esperamicina, enediinnos, duocarmicina A, duocarmicina SA, caliqueamicina, camptotecina, maitansinoides (incluyendo DM1), monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF) y maitansinoides (DM4) y sus análogos, preferiblemente MMAE. Preferiblemente, dicho polipéptido conjugado con una toxina se elige del grupo que consiste en ABL 100-NC003-1, ABL 100-NC003-3, ABL 100-NC003-5, ABL 100-NC003-6 y ABL 100-BF012-1, lo más preferiblemente ABL 100-BF012-1.

Los fármacos, tales como toxinas, pueden usarse como conjugados polipéptidos-toxina y/o conjugados dímero-toxina e incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al.* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (el documento EP 1391213; Liu *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión al ADN o la inhibición de topoisomerasas.

Se contemplan conjugados de un polipéptido usado en y/o dímero de la invención y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno, caliqueamicina y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad como toxina.

Otros fármacos, tales como agentes antitumorales que pueden conjugarse con los dímeros de la invención y/o los polipéptidos usados en la invención incluyen BCNU, estreptozotocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 5.053.394, 5.770.710, así como las esperamicinas (la patente estadounidense n.º 5.877.296).

Los fármacos, tales como toxinas activas enzimáticamente y sus fragmentos, que pueden usarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, la alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla además un CPF formado entre un dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención puede comprender un átomo altamente radiactivo. Hay una variedad de isótopos radiactivos disponibles para la producción de CPF radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de modos conocidos. Por ejemplo, el polipéptido puede sintetizarse biológicamente o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácido adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} a través de un residuo de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un residuo de lisina. El método de yodógeno (Fraker *et al.* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo-123. El yodo-125 puede radiomarcarse mediante el método de perla de yodo tal como se describe en Valentine, M. A. *et al.*, (1989) *J. Biol. Chem.* 264:11282. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

El experto en la técnica puede establecer dosificaciones de tratamiento únicas eficaces (por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces) de CPF radioconjugados que dependen, entre otras cosas del radiomarcador específico, la semivida del CPF, la toxicidad, la diana, etc. Preferiblemente, las dosificaciones de tratamiento únicas eficaces oscilan preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre

aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi.

La generación de compuestos de CPF puede lograrse mediante cualquier técnica conocida por el experto en el campo de los CAF. En resumen, los compuestos de CPF pueden incluir dímero de la invención y/o polipéptido usado en la invención como la unidad de anticuerpo, un fármaco, y opcionalmente un ligador que une el fármaco y el agente de unión.

Se conocen métodos para determinar si un fármaco o un conjugado anticuerpo-fármaco ejerce un efecto, por ejemplo un efecto citostático y/o citotóxico sobre una célula. En general, el efecto, por ejemplo una actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo puede medirse: exponiendo células de mamífero que expresan una proteína diana del conjugado de anticuerpo en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un periodo de desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 5 días; y midiendo la viabilidad celular. Pueden usarse ensayos basados en células *in vitro* para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de apoptosis (activación de caspasas) del conjugado fármaco-anticuerpo. Estos métodos son aplicables igualmente a los CPF.

Por consiguiente, la invención se refiere a un polipéptido usado en la invención comprendido en el dímero de la invención que comprende además un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina. En aras de la claridad, la invención se refiere a un dímero (que comprende polipéptidos usados en la invención) que comprende además un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido usado en la invención comprendido en el dímero de la invención conjugado con un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina. En aras de la claridad, la invención se refiere a un dímero (que comprende polipéptidos usados en la invención) conjugado con un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina.

Los CPF combinan la selectividad de un resto de direccionamiento altamente selectivo con la potencia de destrucción de un fármaco. Para que el polipéptido usado en la invención (ya esté comprendido o no en el dímero de la invención) funcione como un componente satisfactorio de un CPF, es necesario que el polipéptido se una al antígeno diana en la superficie de la célula diana, por ejemplo una célula tumoral. Para la mayoría de los fármacos, el CPF ha de internalizarse por la célula para ser eficaz (Trail 2013 Antibodies 2:113-129 revisión). Tras la internalización, el CPF se transporta al lisosoma en el que el procesamiento intracelular posterior del CPF liberará el fármaco biológicamente activo para que ejerza sus efectos (tóxicos) en la célula diana, tal como una célula tumoral. No sólo los fármacos biológicamente activos deben internalizarse, sino que también los isótopos radiactivos para la radioinmunoterapia (RIT) se internalizan preferiblemente, con el propósito de localizar en gran medida los efectos tóxicos de la carga útil radiactiva. El direccionamiento preciso por los polipéptidos radiomarcados usados en la invención (ya estén comprendidos o no en el dímero de la invención) provoca una citotoxicidad selectiva y extremadamente eficaz de las células diana (por ejemplo, células tumorales) a dosis relativamente bajas de radiactividad, minimizando los efectos secundarios.

Los inventores demostraron que la internalización global de los dímeros de la invención parecía ser más potente y eficaz que los monómeros correspondientes y las referencias bivalentes, especialmente en células con un bajo número de dianas. Esta diferencia en la internalización es menos pronunciada pero todavía significativa en células que expresan una diana en niveles extremadamente altos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un dímero de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer, en el que dicho dímero se internaliza. Preferiblemente dicho dímero se conjuga con un fármaco (citotóxico).

Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un dímero de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dicho dímero se internaliza. Preferiblemente dicho dímero se conjuga con un fármaco (citotóxico).

En una realización, el dímero de la invención puede usarse para seleccionar como diana células que expresan un bajo número de sitios de unión para los V_{HH} correspondientes, tal como menos de $10 \cdot 10^5$ sitios de unión, tal como $5 \cdot 10^5$ sitios de unión, o incluso menos de $10 \cdot 10^4$ sitios de unión, $5 \cdot 10^4$ sitios de unión, $1 \cdot 10^4$ sitios de unión, o menos de 5000 sitios de unión, por ejemplo menos de 4000, 3000 o incluso menos de 2000 sitios de unión, tal como 1000 sitios de unión o incluso menos.

En una realización, la presente invención se refiere a un dímero tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de cáncer, en el que dicho dímero se internaliza. Preferiblemente dicho dímero se conjuga con un fármaco (citotóxico).

En una realización, la presente invención se refiere al uso de un dímero tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dicho dímero se internaliza. Preferiblemente dicho dímero se conjuga con un fármaco (citotóxico).

La mayoría de los fármacos usados en el tratamiento de cáncer son hidrófobos. Esto es ventajoso, puesto que estos

fármacos hidrófobos pueden penetrar en la membrana celular. Sin embargo, estos fármacos pueden penetrar en cualquier membrana, también de células no cancerosas. Aun así, estos fármacos son eficaces puesto que las células cancerosas se dividen más rápidamente que las células "normales". Se apreciará que el uso de estos fármacos conlleva efectos secundarios graves. Para un enfoque más dirigido, varios de estos fármacos se han acoplado a anticuerpos convencionales, que se usan como vehículo para seleccionar como diana preferiblemente la célula cancerosa. Estos anticuerpos convencionales tienen un tamaño de aproximadamente 150 kD, mientras que los fármacos tienen un tamaño, en promedio, de aproximadamente 1 kD. Por tanto, la razón de tamaño de anticuerpo:fármaco es de aproximadamente 150:1. Esta razón es uno de los motivos por los que la hidrofobicidad del fármaco tiene poca influencia en conjugado anticuerpo:fármaco (CAF) en total.

Se ha demostrado que las propiedades fisicoquímicas de los ISVD dependen en gran medida de sus aminoácidos expuestos en superficie que se exponen al disolvente. Esto se refleja en la gran cantidad de formulaciones diferentes usadas para los ISVD. En gran contraste con un anticuerpo convencional, un ISVD tiene un tamaño de sólo aproximadamente 15 kD. Por consiguiente, la razón de tamaño de ISV:fármaco es de sólo 15:1, es decir, 10 veces menor que para los anticuerpos convencionales. Por consiguiente, las características hidrófobas de un fármaco tienen una influencia desproporcionadamente mayor en las propiedades del CPF. De hecho, un problema principal con los CPF es la agregación. Sin embargo, se observó sorprendentemente que los CPF de la invención eran estables, eran susceptibles de administración *in vivo* y eran capaces de reducir el crecimiento tumoral *in vivo*.

En una realización, la presente invención proporciona un dímero conjugado con una toxina para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesita.

La presente invención se refiere a un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones para su uso en terapia, preferiblemente para su uso en el tratamiento de cáncer. Además, la presente invención se refiere al uso de un dímero tal como se define mediante las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

El término "cáncer" se refiere a cualquier cáncer provocado por la proliferación de células neoplásicas malignas, tal como tumores, neoplasias, carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas. Los cánceres de interés para el tratamiento incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, tumores malignos linfoides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hueso, cáncer de la sangre o cáncer del sistema linfático. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón escamoso, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer bucal, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama incluyendo, por ejemplo, cáncer de mama positivo para HER2, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de células B, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, y metástasis asociadas.

Un "cáncer de tumor sólido" es un cáncer que comprende una masa anómala de tejido. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de tumor sólido (por ejemplo, carcinomas y linfomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, sarcoma o carcinoma corticosuprarrenal).

La presente divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con el cáncer (por ejemplo, tal como se definieron anteriormente).

Tal como se usa en el presente documento, y tal como se entiende bien en la técnica, "tratar" una afección o "tratamiento" de la afección (por ejemplo, las afecciones descritas en el presente documento, tales como cáncer) es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, tales como resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, entre otros, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones; disminución de la extensión de la enfermedad, el trastorno o la afección; estado de enfermedad, trastorno o afección estabilizado (es decir, sin empeoramiento); prevención de la propagación de la enfermedad, el trastorno o la afección; retrasar o ralentizar el progreso de la enfermedad, el trastorno o la afección; mejora o paliación de la enfermedad, el trastorno o la afección; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Paliar" una enfermedad, un trastorno o una afección significa que la extensión y/o las manifestaciones clínicas no deseadas de la enfermedad, el trastorno o la afección se reducen y/o el transcurso temporal de la progresión se ralentiza o alarga, en comparación con la extensión o el transcurso temporal en ausencia de tratamiento.

El término una "cantidad eficaz" de un agente (por ejemplo, cualquiera de los conjugados anteriores), tal como se usa en el presente documento, es aquella cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, tales como resultados clínicos y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en el que se aplica.

Por "sujeto" se entiende un humano o animal no humano (por ejemplo, un mamífero).

La presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de cáncer que comprende la administración a un paciente de un dímero de la invención.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar y/o prevenir y/o aliviar trastornos relacionados con artritis reumatoide, psoriasis o hipersecreción de mucosidad en el pulmón, que comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento (una cantidad eficaz de) un polipéptido conjugado con una toxina tal como se describe en el presente documento.

La presente divulgación proporciona un método para administrar un polipéptido o dímero profiláctico o terapéutico conjugado con una toxina a una ubicación, tipo de célula o tejido específico en el cuerpo, comprendiendo el método las etapas de administrar a un sujeto un polipéptido conjugado con una toxina tal como se describe en el presente documento o un dímero conjugado con una toxina tal como se describe en el presente documento. La presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que lo necesita que comprende administrar un polipéptido conjugado con una toxina tal como se describe en el presente documento.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un dímero tal como se reivindica conjugado con una toxina tal como se describe en el presente documento. La presente invención proporciona un dímero de la invención, junto con un portador farmacéuticamente aceptable; opcionalmente junto con un agente adicional.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido usado en la invención comprendido en el dímero de la invención, conjugado con un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina tal como se describe en el presente documento. Preferiblemente, dicho polipéptido comprende un ISV dirigido contra EGFR, que potencialmente comprende además un ISVD dirigido contra albúmina sérica.

En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido conjugado con una toxina tal como se describe en el presente documento, en el que al menos un ISVD inhibe y/o bloquea la interacción entre el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el EGFR.

El término "composición farmacéutica", tal como se usa en el presente documento, representa una composición que contiene un compuesto descrito en el presente documento formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se fabrica o vende con la aprobación de una agencia normativa gubernamental como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento de la enfermedad en un mamífero. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, por ejemplo, para administración oral en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, un comprimido, una cápsula, un comprimido oblongo, cápsula de gelatina o jarabe); para administración tópica (por ejemplo, como crema, gel, loción o pomada); para administración intravenosa (por ejemplo, como disolución estéril libre de émbolos particulados y en un sistema de disolventes adecuado para uso intravenoso); o en cualquier otra formulación descrita en el presente documento.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición que comprende el dímero de la invención, preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica, que opcionalmente comprende además al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y/o adyuvante, y que opcionalmente comprende uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Las composiciones que contienen una cantidad eficaz pueden administrarse para la planificación de tratamientos con radioterapia, terapéuticos o de diagnóstico. Cuando se administra para la planificación del tratamiento con radioterapia o con propósitos de diagnóstico, el conjugado se administra a un sujeto en una dosis eficaz para diagnóstico y/o una cantidad eficaz para determinar la dosis terapéuticamente eficaz. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un sujeto (por ejemplo, un humano) que ya padece una afección (por ejemplo, cáncer) en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas del trastorno y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr este propósito se define como una "cantidad terapéuticamente eficaz", una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente al menos un síntoma asociado con la enfermedad o una afección médica. Por ejemplo, en el tratamiento de cáncer, un agente o compuesto que disminuye, previene, retrasa, suprime o detiene cualquier síntoma de la enfermedad o afección sería terapéuticamente eficaz. No se requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o compuesto para curar una enfermedad o afección, pero proporcionará un tratamiento para una enfermedad o afección de tal manera que el inicio de la enfermedad o afección se retrase, dificulte o prevenga, o los síntomas de la enfermedad o afección mejoren o la duración de la enfermedad o afección cambie o, por ejemplo, sea menos grave o la recuperación se acelere en un individuo. Los dímeros de la invención pueden usarse para el tratamiento de cáncer administrando a un sujeto una primera dosis de cualquiera de los dímeros o las composiciones anteriores en una cantidad eficaz para la planificación del tratamiento con radioterapia, seguido de la administración de una segunda dosis de cualquiera de los dímeros o las composiciones anteriores en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Las cantidades eficaces para estos usos pueden depender de la gravedad de la enfermedad o afección y el peso y el estado general del sujeto. La cantidad terapéuticamente eficaz de los dímeros y las composiciones de la invención y

5 usados en los métodos de esta divulgación aplicados a mamíferos (por ejemplo, humanos) puede determinarla el
experto en la técnica con la consideración de las diferencias individuales en edad, peso, y la condición del mamífero
Debido a que determinados CPF de la invención presentan una capacidad potenciada para seleccionar como diana
células cancerosas y residualizar, la dosificación de los compuestos de la invención puede ser menor que (por ejemplo,
10 menor que o igual a aproximadamente el 90%, el 75%, el 50%, el 40%, el 30%, el 20%, el 15%, el 12%, el 10%, el
8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2%, el 1%, el 0,5% o el 0,1% de) la dosis equivalente de lo requerido para
un efecto terapéutico del agente no conjugado. Los agentes de la invención se administran a un sujeto (por ejemplo,
un mamífero, tal como un humano) en una cantidad eficaz, que es una cantidad que produce un resultado deseable
en un sujeto tratado. Las cantidades terapéuticamente eficaces también pueden determinarse empíricamente por los
15 expertos en la técnica. Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones de la invención que incluyen una
cantidad eficaz pueden llevarse a cabo seleccionándose los niveles y patrones de dosis por el médico que trata. La
dosis y la pauta posológica pueden determinarse y ajustarse en función de la gravedad de la enfermedad o afección
en el sujeto, lo que puede monitorizarse en la totalidad del transcurso del tratamiento según los métodos puestos en
práctica comúnmente por los médicos o los descritos en el presente documento.

15 Los dímeros de la presente invención pueden usarse en combinación con métodos convencionales de tratamiento o
terapia o pueden usarse por separado de los métodos convencionales de tratamiento o terapia.

20 Cuando los dímeros de esta invención se administran en terapias combinadas con otros agentes, pueden
administrarse de manera secuencial o concurrente a un individuo. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas
según la presente invención pueden comprender una combinación de un compuesto de la presente invención en
asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en el presente documento, y otro
agente terapéutico o profiláctico conocido en la técnica.

25 Generalmente, para su uso farmacéutico, los dímeros de la invención y/o polipéptidos usados en la invención pueden
formularse como una preparación o composición farmacéutica que comprende al menos un dímero de la invención
y/o polipéptido usado en la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y/o
adyuvante, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. A modo
30 de ejemplos no limitativos, tal formulación puede estar en una forma adecuada para administración oral, para
administración parenteral (tal como mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión
intravenosa), para administración tópica, para administración por inhalación, mediante un parche cutáneo, mediante
un implante, mediante un supositorio, etc., en la que se prefiere la administración parenteral. Tales formas de
administración adecuadas que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo del modo de administración,
35 así como los métodos y portadores para su uso en la preparación de las mismas, estarán claros para el experto y se
describen adicionalmente en el presente documento. Tal preparación o composición farmacéutica generalmente se
denominará en el presente documento "composición farmacéutica". Una preparación o composición farmacéutica para
su uso en un organismo no humano generalmente se denominará en el presente documento "composición veterinaria".

40 Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un dímero
de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para su uso
farmacéutico), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

45 Generalmente, los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier
manera adecuada conocida *per se*. Se hace referencia, por ejemplo, a los antecedentes de la técnica generales citados
anteriormente (y en particular a los documentos WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO
04/041867 y WO 08/020079) así como a los manuales convencionales, tales como Remington's Pharmaceutical
Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Company, USA (1990), Remington, Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición,
Lippincott Williams and Wilkins (2005); o el Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim,
50 2007 (véanse, por ejemplo, las páginas 252-255).

50 Los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier manera
conocida *per se* para anticuerpos convencionales y fragmentos de anticuerpo (incluyendo ScFv y diacuerpos) y otras
proteínas farmacéuticamente activas. Tales formulaciones y métodos para preparar las mismas estarán claros para el
experto y, por ejemplo, incluyen preparaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, administración
55 intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intraarterial o intratecal) o para administración
tópica (es decir, administración transdérmica o intradérmica).

60 Las preparaciones para administración parenteral pueden ser, por ejemplo, disoluciones estériles, suspensiones,
dispersiones o emulsiones que son adecuadas para infusión o inyección. Los portadores o diluyentes adecuados para
tales preparaciones por ejemplo incluyen, sin limitación, los mencionados en la página 143 del documento WO
08/020079. Habitualmente, se preferirán disoluciones o suspensiones acuosas.

65 Por tanto, los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, en
combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible
asimilable. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, pueden someterse a
compresión para dar comprimidos o pueden incorporarse directamente con los alimentos de la dieta del paciente. Para

la administración terapéutica oral, los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención pueden combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1% del polipéptido usado en y/o dímero de la invención. Su porcentaje en las composiciones y preparaciones puede variar, por supuesto, y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad del polipéptido usado en y/o dímero de la invención en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, las píldoras, cápsulas, y similares, también pueden contener aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes y agentes edulcorantes o aromatizantes, por ejemplo, los mencionados en las páginas 143-144 del documento WO 08/020079. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener los polipéptidos, compuestos y/o constructos de la invención, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención pueden incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

Las preparaciones y formulaciones para administración oral también pueden dotarse de un recubrimiento entérico que permitirá que los constructos de la invención resistan el entorno gástrico y pasen al intestino. De manera más general, las preparaciones y formulaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para la administración a cualquier parte deseada del tracto gastrointestinal. Además, pueden usarse supositorios adecuados para la administración al tracto gastrointestinal.

Los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención también pueden administrarse por vía intravenosa o por vía intraperitoneal mediante infusión o inyección. Ejemplos particulares son tal como se describen más detalladamente en las páginas 144 y 145 del documento WO 08/020079 o en el documento PCT/EP2010/062975 (documento completo).

Para la administración tópica, los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención pueden aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido. Ejemplos particulares son tal como se describen más detalladamente en la página 145 del documento WO 08/020079.

Las dosificaciones útiles de los polipéptidos, compuestos y/o constructos de la invención pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en modelos animales. Se conocen en la técnica métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales a humanos; por ejemplo, véase el documento US 4.938.949.

Generalmente, la concentración de los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-2,5% en peso.

La cantidad de los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención requerida para su uso en tratamiento variará no sólo con el polipéptido y/o dímero particular seleccionado sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que va a tratarse y la edad y condición del paciente y, en última instancia, quedará al criterio del doctor o médico clínico que le atienda. Además, la dosificación de los polipéptidos usados en y/o dímeros de la invención varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto u órgano diana.

La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, tal como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La subdosis en sí misma puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en una cantidad de administraciones diferenciadas, poco separadas.

Un régimen de administración podría incluir un tratamiento diario a largo plazo. Por "a largo plazo" se entiende al menos dos semanas y preferiblemente, varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación pueden determinarse por un experto en la técnica usando sólo la experimentación de rutina dada las enseñanzas en el presente documento. La dosis también puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier complicación.

Ejemplos

1 Generación de elementos estructurales.

Se generaron diversos constructos en *P. pastoris*, partiendo de los Nanobodies de unión a EGFR 7D12 y 9G08, y un Nanobody de unión a albúmina ALB11 tal como se representa en la tabla 4.

Tabla 4: Constructos

5

Nombre del producto	Elementos estructurales
T023800001-A	7D12-20GS-ALB11-GGC-A
T023800003-A	7D12-20GS-7D12-GGC-A
T023800005-A	7D12-20GS-9G08-GGC-A
T023800006-A	7D12-20GS-7D12-20GS-ALB11-GGC-A
T023800008-A	7D12-20GS-9G08-20GS-ALB11-GGC-A
Dímero de T023800001	$N[7D12-ALB11-GGC]_C-S-S-C[CGG-ALB11-7D12]_N$

1.1 Fusión genética

10 El acoplamiento de los elementos estructurales 7D12 y Alb11 y los ligadores en diversas transposiciones (orden) en T023800001, T023800003, T023800005 y T023800006 se realizó mediante fusión genética según protocolos convencionales, por ejemplo, según se describe por Garaicoechea *et al.* (Garaicoechea *et al.* (2008) *J Virol.* 82: 9753-9764). Se generaron polipéptidos que comprendían diversas longitudes y composiciones de ligador (orden de ISVD e ISVD individuales). También se construyeron extensiones C-terminales, incluyendo GGC, mediante fusiones genéticas. Se proporcionan las secuencias de T023800001 (SEQ ID NO: 27), T023800003 (SEQ ID NO: 28),
15 T023800005 (SEQ ID NO: 29) y T023800006 (SEQ ID NO: 30) y T023800008 (SEQ ID NO: 31) en la tabla 6.

Se demostró la viabilidad de construir diferentes extensiones C-terminales que comprenden un resto de cisteína en el extremo C-terminal fabricando diversos polipéptidos con diferentes extensiones C-terminales: -C (SEQ ID NO:1), -GC (SEQ ID NO: 2), -GGC (SEQ ID NO: 3), -GGGC (SEQ ID NO: 4), -CG (SEQ ID NO:10), -GCG (SEQ ID NO:11), -GGGCG (SEQ ID NO:13), -GGGGCGGGG (SEQ ID NO:15) y -AAAC (SEQ ID NO: 8) (datos no mostrados).
20

1.2 Extensión de alanina

25 Se conjugó un resto de alanina (N-maleoil- β -alanina; Sigma-Aldrich) mediante la química de la maleimida al grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína ubicada de manera C-terminal en condiciones casi neutras (pH 6,5-7,5) para formar uniones tioéter estables según protocolos bien establecidos (véase a continuación). En resumen, en primer lugar se determinó la concentración del polipéptido en cuestión. Se añadió un exceso molar 2-5 de N-maleoil- β -alanina al polipéptido para bloquear todas las cisteínas disponibles. Se incubó la mezcla durante 1 h a TA seguido de una incubación durante la noche a 4°C. La eficiencia de conjugación se confirmó mediante CL-EM al día siguiente. Los polipéptidos que comprendían la extensión de Ala se purificaron hasta homogeneidad mediante cromatografía SEC para retirar el exceso de N-maleoil- β -alanina.
30

Los constructos resultantes se designaron como T023800001-A, T023800003-A, T023800005-A y T023800006-A (figura 1; tabla 4).
35

Se demostró además que también podía conjugarse una alanina para constructos con extensiones C-terminales que comprendían cisteína que eran diferentes de GGC (véase también 1.1 anteriormente; datos no mostrados).

1.3 Dimerización

40 Se realizó el acoplamiento de los polipéptidos para dar un dímero mediante conjugación química en el medio usado de *Pichia*, en el que las cisteínas C-terminales en la extensión C-terminal en cada uno de dichos dos polipéptidos se oxidaron a un derivado de disulfuro cistina a través de sus restos de tiol a pH casi neutro. Para optimizar el proceso de oxidación, se añadieron iones de cobre oxidantes (Cu^{2+} en forma de $CuSO_4$) en esencia tal como se establece en el documento WO2010/125187. Los dímeros se purificaron hasta homogeneidad y posteriormente se analizaron mediante cromatografía de exclusión molecular. También se verificaron muestras mediante CL-EM. Los datos resultantes demostraron que casi el 100% de los restos de tiol se oxidaron después del tratamiento con $CuSO_4$ 1 mM durante 2 horas a temperatura ambiente. En ninguno de los cromatogramas se observó la formación de prepicos significativos (no deseados). Además, en ninguno de los cromatogramas se observó evidencia de la formación de prepicos significativos que indiquen que el tratamiento con cobre no parece oxidar las metioninas en la proteína, ni el análisis de masa total detecta ningún aumento de masa de +16 Da que concordaría con una única oxidación en, por ejemplo, una metionina.
45
50

Se prepararon dímeros a partir de T023800001, T023800003, T023800005 y T023800006. El dímero de T023800001

(designado dímero de T023800001) se muestra en la figura 1.

1.4 Estabilidad

5 Se sometieron a prueba los diferentes constructos de la invención, por ejemplo dímeros, polipéptidos y referencias para determinar la estabilidad después del almacenamiento en condiciones de estrés rigurosas. Estas condiciones comprendieron la incubación de los polipéptidos de la invención durante un periodo de tiempo más largo (3 semanas y 6 semanas) a diferentes temperaturas (25°C y 40°C), esencialmente tal como se establece en el documento WO2014/184352.

10 Se demostró que los polipéptidos usados en la invención, por ejemplo con una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína, y los dímeros tenían propiedades similares a las moléculas parentales de las que derivaban y eran estables durante periodos prolongados a 4°C, 25°C así como a 40°C, sin degradación química significativa ni modificaciones (datos no mostrados). Además, la estabilidad después de diversos ciclos de congelación-descongelación y almacenamiento a 4°C durante un periodo de tiempo más largo (es decir, > 4 d) no cambió, tal como se muestra en los ensayos funcionales (remítase a continuación)

2 Caracterización de polipéptidos que se unen a células MDA-MB-468

20 Se caracterizaron polipéptidos en un ensayo de competencia de unión para evaluar las afinidades de unión a EGFR.

Se usó la línea celular de cáncer de células de mama MDA-MB-468 (glándula mamaria/mama; derivado del sitio metastásico: derrame pleural; ABL216).

25 Para detectar la unión del polipéptido a células que expresan EGFR, se usó el 7D12 marcado con etiqueta FLAG como competidor. Para configurar el ensayo, en primer lugar se realizó una serie de titulación del 7D12 marcado con etiqueta FLAG en las células MDA-MB-468. Se eligió la CE₉₀ (41 nM) de 7D12 marcado con etiqueta FLAG en una configuración de competencia en la que se titularon los polipéptidos no marcados con etiqueta.

30 En resumen, se transfirieron 100.000 células a la placa. Se lavaron las placas dos veces mediante centrifugación a 200 g durante 3 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron al pocillo 50 µl de polipéptido purificado junto con 50 µl de 7D12 marcado con etiqueta FLAG (concentración final 41 nM) en un total de 100 µl por pocillo. Después de 90 minutos de incubación a 4°C, se lavaron las placas tres veces mediante centrifugación durante 30 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µl por pocillo de 0,5 µg de AcM anti-etiqueta de ratón (Sigma-Aldrich, n.º de cat. F1804) o tampón de FACS, seguido de una incubación de 30 minutos a 4°C. Se lavaron las células tres veces mediante centrifugación a 200 g durante 3 minutos a 4°C. Después de retirar el sobrenadante, se añadieron a las células 110 µl por pocillo de anticuerpo de cabra anti-ratón-PE o IgG de cabra anti-humano-PE y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Luego se centrifugaron las placas durante 30 minutos a 200 g a 4°C, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µl por pocillo de tampón de FACS y secuencialmente se lavaron las placas tres veces mediante centrifugación a 200 g durante 3 minutos a 4°C. A continuación, se tiñeron las células muertas con 100 µl de TOPRO (Molecular Probes, T3605) por pocillo y se midieron las células secuencialmente en el analizador FACS Canto (Becton Dickinson). En primer lugar se colocó una regulación en las celdas intactas según se determinó a partir del perfil de dispersión. Luego, se descartaron las células muertas por su perfil de fluorescencia a partir de la tinción con TOPRO (5 nM, Molecular Probes, T3605). Como controles, se tomaron condiciones en las que no había polipéptido presente o un polipéptido irrelevante conocido (datos no mostrados).

50 Se evaluaron el T023800001-A monovalente (indicado en el presente documento también como T023800001), T023800003-A de semivida extendida (HLE, por sus siglas en inglés) (indicado en el presente documento también como T023800003), T23800005-A (indicado en el presente documento también como T023800005), T023800006-A (indicado en el presente documento también como T023800006) y el dímero de T023800001 no reducido.

Se representan los resultados en la figura 2.

55 A partir de estos resultados puede concluirse que la competencia de T023800001, T023800003, T023800005 y T023800006 con CE₉₀ de 7D12-FLAG (es decir, 41nM) da como resultado una K_i de 15 nM, 0,63 nM, 0,25 nM y 1,16 nM para T023800001, T023800003, T023800005 y T023800006, respectivamente. Se calculó la constante de inhibición absoluta K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

$$K_i = \frac{CI50}{\frac{[L]}{K_D} + 1}$$

60 Inesperadamente, el dímero de T023800001 mostró una K_i de 0,12 nM, que es 2 veces mejor que la de T023800005-A, el constructo fusionado genéticamente de mejor rendimiento, e incluso más de 9 veces mejor que la de T023800006-A, el agente de comparación directo del dímero de T023800001.

3 Cuantificación de la fosforilación de EGFR en la línea celular HER14

Para verificar si la ganancia de potencia observada en la FACS de competencia (véase el ejemplo 2 anterior) también se traduce en una modulación de la transducción de señales mediada por EGFR, los inventores establecieron un experimento de bloqueo de fosforilación de EGFR mediada por EGF por Nanobodies en células NHI 3T3/HER14. Los constructos usados fueron T023800001-A y T023800006-A, así como dímero de T023800001. Se evaluó la inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de EGFR en células HER14 que expresaban sólo EGFR.

En resumen, se sembraron células HER14 por duplicado en placas de cultivo de 96 pocillos recubiertas con gelatina al 0,1% y se cultivaron en medio de cultivo DMEM que contenía FBS/BS al 10% durante 24 h. Al día siguiente, se privaron de suero las células en medio complementado con FCS al 0,1% durante 24 h y luego se incubaron con los constructos seguido de estimulación durante 10 minutos con 0,5 nM de EGF humano recombinante (R&D Systems, n.º de cat. 236-EG). Las concentraciones de EGF se basaron en la CE50 obtenida en las células HER14 ($CE_{50} = 3,5$ ng/ml). En cada placa se incluyó un polipéptido de control irrelevante como referencia (datos no mostrados). Se enjuagaron las monocapas dos veces con D-PBS enfriado con hielo y posteriormente se lisaron en tampón RIPA enfriado con hielo sustituido por PMSF 1 mM. Se midió la activación de receptor dependiente de EGF en lisados celulares usando un kit de lisado celular completo de fosfo(Tyr1173)/EGFR total (Meso Scale Discovery - K15104D). Se cargaron las placas con 30 µl de lisado, se incubaron 1 h a TA con agitación y se procesaron según el protocolo del fabricante. Se leyeron las placas en el Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Se calculó el porcentaje de fosfoproteína con respecto a proteína total usando la fórmula: $(2 \times \text{proteína p}) / (\text{proteína p} + \text{proteína total}) \times 100$.

Se representan los resultados en la figura 3.

Sólo se observó una inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de EGFR en células Her-14 que expresaban EGFR. Puesto que la fosforilación funcional sólo está mediada a través de la señalización de EGFR, se espera que la ganancia de avidéz mediante formatos multivalentes se traduzca en una mayor inhibición de la fosforilación de EGFR de una manera específica de la célula.

Incluso de manera más pronunciada que los resultados de la FACS de competencia, el dímero de T023800001 (4,4 nM) muestra un aumento de potencia de 5-6 veces en comparación con el Nanobody bivalente establecido T023800006-A (26,6 nM). El T023800001-A monovalente produjo una potencia de 10,5 nM.

4 Preparación de Nanobodies monoméricos extendidos con cisteína a través de SEC

4.1 Información de antecedentes

Se descubrió que los polipéptidos usados en la invención que comprendían al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) y una extensión C-terminal que comprendía un resto de cisteína en el extremo C-terminal son adecuados para reacciones de acoplamiento basadas en la química de la maleimida (véase el ejemplo 1.2 anterior)

Para convertir los dímeros en polipéptidos monoméricos y hacer que la cisteína C-terminal esté disponible para el acoplamiento, era necesario llevar a cabo una reducción. Sin embargo, debe tenerse cuidado para diseñar condiciones optimizadas que den como resultado la reducción del dímero de disulfuro sin reducir los puentes disulfuro de ISVD canónicos internos. Se llevó a cabo la reducción usando preferiblemente DTT o TCEP. A diferencia de TCEP, es necesario eliminar el DTT para crear condiciones de acoplamiento óptimas. Por medio de cromatografía de exclusión molecular (SEC), el Nanobody monomérico se separa del Nanobody dimérico no reducido y el DTT.

4.2 Protocolo de reducción

El protocolo de reducción consistió en un tratamiento durante la noche con DTT 10 mM a 4°C (o durante 2 h como mínimo a temperatura ambiente) en D-PBS. La concentración de ISVD fue de entre 2 y 10 mg/ml. Se demostró que estas condiciones no afectaron al enlace disulfuro canónico interno (véase la figura 4 a continuación). Se obtuvieron resultados similares usando TCEP, en este caso se usó TCEP inmovilizado (Pierce, gel reductor de disulfuro de TCEP inmovilizado, n.º 77712) según el protocolo del fabricante. Alternativamente, se usó una exposición corta a TCEP 10 mM durante 30 minutos a 4°C.

4.3 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Para la purificación, se usó preferiblemente una columna Superdex 75 (GE Healthcare) (intervalo de separación de 5-100 kDa) para polipéptidos que comprendían hasta tres ISVD para generar productos monoméricos reducidos. Con propósitos analíticos, se usaron columnas de HPLC tales como SEC-3 de Agilent. El tampón de equilibrado y de ejecución fue D-PBS.

Se proporciona un ejemplo de un producto puro completamente reducido después de SEC en la figura 5.

Después de la SEC, se usó inmediatamente el polipéptido monomérico reducido para la conjugación o se congeló

para impedir la reoxidación para dar dímeros. La evidencia experimental sugiere que la fracción monomérica reducida de los polipéptidos extendidos con GGC es estable hasta 24 h a 4°C en D-PBS (datos no mostrados).

5 Se redujo un polipéptido que comprendía dos ISVD con DTT 10 mM durante 2 h a la temperatura ambiental y se dimensionó en una columna Superdex 75 XK 16/60 (GE Healthcare) equilibrada en D-PBS. Sólo se detectaron cantidades minúsculas de dímero; se redujo el resto del material a monómero y, por tanto, estaba listo para la conjugación. Se muestra el peso molecular del patrón de filtración en gel (Biorad), línea de puntos, por encima de los picos respectivos.

10 5 Polipéptidos acoplados a MMAE

El agente antimetabólico hidrófobo monometil-auristatina E (MMAE) es un análogo sintético del producto natural dolastatina 10. La MMAE es un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina en las células en división.

15 En este ejemplo, se estableció que se iba a acoplar MMAE a la cisteína C-terminal liberada de los polipéptidos usados en la invención. En resumen, se conjugó MMAE a través de un ligador de valina-citrulina al polipéptido con propósitos de direccionamiento de fármacos. El ligador de valina-citrulina es altamente estable en suero, pero se ve escindido por enzimas lisosómicas como cathepsina B después de la internalización del conjugado por las células diana. Las siguientes abreviaturas de ligador se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: Val Cit es un sitio de dipéptido de valina-citrulina en un ligador escindible por proteasa; PAB es p-aminobenzoilo; mc es maleimida conjugada.

20 Se redujeron los Nanobodies con DTT 10 mM durante la noche a 4°C y luego se intercambié el tampón para retirar el exceso de DTT. Se realizó la conjugación con mc-val-cit-PAB-MMAE (PM de aproximadamente 0,7 kDa; figura 6) a 22°C. Después de 1 hora, se extinguió la reacción con 20 equivalentes de N-acetil-cisteína por fármaco libre. Se purificó el producto resultante mediante concentración centrífuga y se intercambié el tampón al tampón final. Para la purificación a mayor escala, es más adecuado un método de diafiltración no centrífugo. Se somete a filtración esterilizante (0,2 µm) la disolución del producto.

30 Polipéptidos conjugados con MMAE:

- T023800001 => T023800001-mc-val-cit-PAB-MMAE (ABL 100-NC003-1)
- T023800003 => T023800003-mc-val-cit-PAB-MMAE (ABL 100-NC003-3)
- T023800005 => T023800005-mc-val-cit-PAB-MMAE (ABL 100-NC003-5)
- 35 T023800006 => T023800006-mc-val-cit-PAB-MMAE (ABL 100-NC003-6)
- T023800008 => T023800008-mc-val-cit-PAB-MMAE (ABL 100-BF012-1)

40 Se realizó un análisis mediante HIC-HPLC para determinar las razones de fármaco con respecto a polipéptido (RFA). En resumen, se llevó a cabo la HIC analítica de los conjugados usando una columna TOSOH, TSKgel Butyl-NPR (35 × 4,6 mm) conectada a un sistema de HPLC Ultimate 3000RS de Dionex. Un gradiente lineal del 100% de tampón A (sulfato de amonio 1,5 M en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0) al 100% de tampón B (isopropanol al 20% (v/v) en fosfato de sodio 50 mM) a lo largo de 30 min a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Se mantuvo a temperatura de la columna a 30°C durante todo el análisis y se realizó detección UV a 280 nm. Para cada análisis, se inyectaron 10 µg de muestra. A los picos se les asignaron razones de fármaco con respecto a polipéptido (RFA) en función de los desplazamientos a un mayor tiempo de retención y por las razones A248/A280. Se calcularon las RFA promedio tomando la suma de los valores de RFA individuales multiplicados por la fracción de la especie (expresada como un decimal). Los polipéptidos usados fueron ABL 100-NC003-1, ABL 100-NC003-3, ABL 100-NC003-5 y ABL 100-NC003-6.

50 Se proporcionan los resultados en la tabla 5

Tabla 5	% de pureza				
	RFA-0	RFA-1	RFA-2	(SEC)	SDS-PAGE
ABL 100-NC003-1	1,3%	98,7%	0%	97,7	96,7
ABL 100-NC003-3	1,1%	98,9%	0%	96,3	96,9
ABL 100-NC003-5	1,7%	98,3%	0%	98,6	96,8
ABL 100-NC003-6	1,2%	98,8%	0%	98,1	95,1
ABL 100-BF012-1	0%	100%	0%	97,6	97,6

55 Se realizó un análisis mediante SDS-PAGE para determinar el estado de oxidación de los polipéptidos. En resumen, se llevó a cabo el análisis mediante SDS-PAGE usando geles de Bis-Tris al 4-12% NUPAGE® (Invitrogen, n.º de cat. NP0321BOX) en condiciones no reductoras con tampón MES. Para el análisis, se cargó 1 µg de muestra (basado en proteína) sobre el gel por carril. Se realizó electroforesis a 200 V durante 35 min. Se tiñó el gel con INSTANTBLUE™

(Expedeon, n.º de cat. ISB1LUK) para la detección de proteínas y se analizó usando el equipo de formación de imágenes IMAGEQUANT® (GE Healthcare).

5 También se proporciona un resumen de los resultados en la tabla 5. Se proporciona un resultado a modo de ejemplo en la figura 7.

10 Con el propósito de confirmar y explicar adicionalmente los resultados de la SDS-PAGE, se realizó un análisis mediante SE-HPLC para determinar el porcentaje de pureza y agregación. En resumen, se llevó a cabo SE-HPLC usando una columna ACQUITY® UPLC BEH200 SEC de Waters (4,6 mm x 30 cm, 1,7 µm), conectada a un sistema Infinity 1260 Bioinert de Agilent. La fase móvil fue tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,8, que contenía isopropanol al 15% (v/v). Se mantuvo constante la velocidad de flujo a 0,15 ml/min. Se mantuvo la columna a 25°C durante todo el análisis. Se llevó a cabo el análisis en una elución isocrática de 30 min con detección UV a 280 nm. Para cada análisis, se inyectaron 10 µg de muestra. Se calcularon el % de pureza y el % de agregación presentes comparando las áreas de pico de los picos principales y los picos de elución temprana, respectivamente, con el área de pico total.

15 Se resumen los resultados en la tabla 5. Se representa un análisis mediante HIC a modo de ejemplo del resultado del acoplamiento en la figura 8.

20 Esto significa que para todos los polipéptidos, la reacción da como resultado una eficiencia de más del 98% de los polipéptidos para la conjugación con el CAF. Además, la reacción dio como resultado una RFA de 1, lo que implica, por un lado, que los ISVD estaban intactos, por ejemplo no se usaron tioles internos y, por otro lado, un número muy controlado de fármacos por polipéptido. Esto da como resultado un mejor perfil de seguridad, en contraste con la distribución gaussiana de fármacos conjugados con anticuerpos convencionales.

25 Tabla 6

Nombre	secuencia de aminoácidos
23800001 (SEQ ID NO: 27)	EVQLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSI SGGSDTLYADSVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGC
23800003 (SEQ ID NO: 28)	EVQLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEVQLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKG RFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGC
23800005 (SEQ ID NO: 29)	EVQLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGTTYADSVKG RFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSGGC
23800006 (SEQ ID NO: 30)	EVQLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEVQLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKG RFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSI SGGSDTLYAD SVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGC
23800008 (SEQ ID NO: 31)	EVQLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGTTYADSVKG RFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGG SGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSI SGGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGC

5.1. Toxicidad celular in vitro de polipéptidos acoplados a MMAE

30 Se sometió a prueba el efecto de los polipéptidos conjugados con MMAE sobre la proliferación celular y/o la toxicidad celular usando el instrumento XCELLIGENCE® (modelo de analizador W380; SN: 281081212038, Roche). El

instrumento cuantifica los cambios en la impedancia eléctrica a medida que las células se unen y se diseminan en una placa de cultivo, presentándolos como un parámetro adimensional denominado índice celular, que es directamente proporcional al área total del pocillo de cultivo tisular que está cubierto por las células (Duchateau *et al.* 2013. *Phys. Status Solidi* 10: 882-888 y Giaever y Keese 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7896-7900). El instrumento XCELLIGENCE® (modelo de analizador W380; SN: 281081212038) utiliza las placas E-plate 96 (ACEA Biosciences; n.º de cat. 05 232 368 001; n.º de lote 20140138; placa 1: n.º de ID 079605; placa 2: n.º de ID 079606) como placa de pocillos de cultivo tisular para sembrar las células. Los constructos usados fueron T023800001-A y T023800001-MMAE, T023800003-A y T023800003-MMAE, T023800005-A y T023800005-MMAE, y T023800006-A y T023800006-MMAE. Se evaluó el efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la proliferación celular de MDA-MB-468 (glándula mamaria/mama; derivado del sitio metastásico: derrame pleural; ABL216) de los Nanobodies no conjugados y conjugados con MMAE con el instrumento XCELLIGENCE® usando el siguiente protocolo.

En resumen, se colocó la estación XCELLIGENCE® en un incubador a 37°C en presencia del 5% de CO₂. Se hacen crecer células MDA-MB-468 en matraces T175 que contenían RPMI (Gibco, n.º de cat.: 72400-021) complementado con P/S al 1% (Gibco, n.º de cat.: 15140-122); piruvato de Na al 1% (Gibco, n.º de cat.: 11360-039) y FBS al 10% (Sigma-Aldrich, n.º de cat.: F7524). Se recogen las células mediante tripsinización, centrifugación y resuspendiéndolas hasta las densidades celulares indicadas. Se añadieron 50 µl de medio celular a cada pocillo de placa E-plate 96 y se realizó una lectura de blanco en el sistema XCELLIGENCE® para medir la impedancia de fondo en ausencia de células. Se transfieren 6000 células (50 µl) a cada pocillo de una placa E-plate 96 y se incuban durante 20 h para dejar que las células se adhieran. Se administraron 100 µl de cada polipéptido en una serie de dilución 1:3, partiendo de 500 nM (el volumen total por pocillo es de 200 µl). se programaron lecturas de impedancia a intervalos de 15 minutos. Se detuvieron los experimentos en el punto de tiempo 162 h (± 7 d). Los índices celulares medidos en el punto de tiempo 116 h después de la siembra para todas las concentraciones sometidas a prueba se usaron para el análisis de dosis-respuesta.

Se representan las curvas de proliferación y las curvas dosis-respuesta, respectivamente, en la figura 9 y la figura 10. Se facilitan los valores de CI₅₀ obtenidos en la tabla 7.

Tabla 7. CI₅₀ y % de inhibición observadas para los polipéptidos no conjugados y conjugados con MMAE

polipéptido	CI ₅₀ (nM)	% de inhibición
T023800001-A	-	-
T023800001-MMAE	28,7	99,8
T023800003-A	-	-
T023800003-MMAE	6,2	76,8
T023800005-A	34,9	44,9
T023800005-MMAE	1,2	91,9
T023800006-A	-	-
T023800006-MMAE	8	89,7

Los polipéptidos no conjugados T023800001-A, T023800003-A, T023800005-A y T023800006-A no muestran ningún efecto aparente sobre las propiedades proliferativas de las células MDA-MB-468, excepto el T023800005-A biparatópico que demuestra un ligero efecto inhibitorio sobre la célula proliferación. En contraste, los polipéptidos conjugados con MMAE T023800001-MMAE, T023800003-MMAE, T023800005-MMAE y T023800006-MMAE muestran claramente un efecto inhibitorio dependiente de la dosis sobre la proliferación celular con una inhibición casi completa a la mayor dosis, tal como se muestra en la figura 9.

5.2 Eficacia *in vivo* de polipéptidos acoplados a MMAE

El estudio de eficacia *in vivo* de conjugados fármaco-polipéptido anti-EGFR se evaluó en un modelo de ratón de xenoinjerto subcutáneo.

Se indujeron tumores mediante inyección subcutánea de 1x10⁷ células FaDu en el flanco derecho de ratones hembra SWISS desnudos sanos de 6-8 semanas de edad. La línea celular FaDu es una línea celular de cáncer de cabeza y cuello establecida a partir de una biopsia en sacabocados de un tumor hipofaríngeo extirpado de un paciente varón de raza blanca/hindú de 56 años. El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzan un volumen medio de entre 100-200 mm.³.

Los animales recibieron una inyección diaria de T023800008-MMAE a 5 mg/kg cada 4 días con un total de 6 inyecciones (Q4Dx6). Un primer grupo de control recibió inyecciones diarias cada 4 días con un total de 6 días de un polipéptido sin unión a EGFR, pero conjugado con MMAE a una dosis equimolar. Un segundo grupo de control recibió una inyección diaria de vehículo cada 4 días para un total de 6 inyecciones. Cada grupo consistió en 12 animales.

Se midieron la longitud y la anchura del tumor dos veces a la semana con calibradores y se estimó el volumen del tumor según la siguiente fórmula:

El conjugado polipéptido-MMAE T023800008-MMAE mostró ser un inhibidor significativo del crecimiento tumoral en comparación con los 2 grupos de control (figura 11).

6 Generación de dímeros biespecíficos.

En este ejemplo, se proporcionan protocolos que permiten la generación de dímeros biespecíficos, es decir, dímeros en los que el polipéptido 1 es diferente del polipéptido 2.

6.1 Protocolo convencional

En primera instancia, se sigue el protocolo del ejemplo 1.3 anterior, pero en el que una cepa de *Pichia* produce ambos polipéptidos diferentes. El acoplamiento de los polipéptidos para dar un dímero también se realiza mediante conjugación química en el medio usado de *Pichia*, en el que las cisteínas C-terminales en la extensión C-terminal en cada uno de dichos dos polipéptidos se oxidan para dar un derivado de disulfuro cistina a través de sus restos de tiol a un pH casi neutro. Para optimizar el proceso de oxidación, se añaden iones de cobre oxidantes (Cu^{2+} en forma de CuSO_4) en esencia tal como se establece en el documento WO2010/125187. Se purifican los dímeros hasta homogeneidad (cromatografía de intercambio iónico) y posteriormente se analizan mediante cromatografía de exclusión molecular. También se verifican muestras mediante CL-EM. El protocolo convencional generará los dímeros biespecíficos NB1-NB2 previstos. Sin embargo, se espera que una fracción también contenga dímeros mono-específicos, por ejemplo NB1-NB1 y NB2-NB2.

6.2 Protocolo alternativo

Pueden generarse heterodímeros de Nanobody (dímeros biespecíficos) usando dos Nb extendidos con cisteína de manera C-terminal distintos sin el uso de un agente de reticulación.

Esto puede lograrse mediante la inmovilización no covalente del primer Nanobody (= NbA) mientras se hace que su sulfhidrilo libre esté disponible para el segundo Nanobody (= NbB) para formar un enlace disulfuro heterodimérico C-terminal.

En una primera etapa, se reduce el NbA para obtener material 100% monomérico. Las condiciones genéricas para reducir las disoluciones de Nanobody típicas [5-10 mg/ml] son DTT 10 mM en D-PBS durante la noche a 4°C o durante 1-2 h a temperatura ambiente (TA). Preferiblemente, se determinan las condiciones óptimas para cada Nanobody individual de modo que su enlace disulfuro canónico permanezca intacto.

En la etapa 2, se une la fracción monomérica de NbA en condiciones reductoras a un portador. Tal portador podría ser una resina de cromatografía que preferiblemente sólo se une a NbA y no a NbB. Se inmoviliza el NbA a baja densidad para evitar la formación de dímeros NbA-NbA mientras está inmovilizado. Tal separación espacial de los NbA individuales podría lograrse cargando la columna usando condiciones de unión subóptimas (es decir, una velocidad de flujo demasiado alta para una resina de afinidad típica) o mediante cromatografía de lecho expandido. Preferiblemente, el portador sólo se une a NbA. Entonces, podría usarse proteína A si el NbA (y preferiblemente no el NbB) es un agente de unión a proteína A. Si los Nanobodies A y B se unen al portador, entonces el portador, después de inmovilizarse NbA, debe saturarse con un Nanobody no extendido con cisteína antes de aplicar el NbB.

En la etapa 3, se aplica un exceso del segundo Nanobody (NbB), también en forma reducida (véase anteriormente), y se hace circular por la columna (opcionalmente en condiciones ligeramente oxidantes). Se hace pasar el NbB sobre el portador hasta que el NbA inmovilizado se compleja por completo con NbB a través de un enlace disulfuro. Esto puede seguirse midiendo la disminución de concentración de NbB para que coincida con una población de NbA saturada. Para esta etapa, se optimizan las condiciones para limitar la cantidad de formación de dímero NbB-NbB. Esta población no se unirá al portador y puede recuperarse y usarse en futuras reacciones de acoplamiento.

En la etapa 4, se recupera la preparación de dímero NbA-NbB de la resina mediante condiciones de elución típicas para esa columna (es decir, condiciones ácidas para la proteína A) y se procesa/formula adicionalmente.

7 Estudio PK de dímeros y polipéptidos conjugados con fármacos.

Tal como se indicó anteriormente, debido a las diferencias de tamaño, la dimerización y la conjugación de fármacos a los polipéptidos usados en la invención tiene una influencia mucho mayor que en los anticuerpos convencionales. Por consiguiente, los inventores establecieron que iban a evaluarse los efectos que tiene una carga útil conjugada con un Nanobody con una RFA = 1 sobre las propiedades PK.

Además, los inventores establecieron que iban a evaluarse las propiedades PK de un dímero de la invención que comprende 2 dominios de unión a albúmina sérica humana ("Alb"). Tal como resultará evidente a partir de los ejemplos anteriores, un dímero que comprende dos restos idénticos (es decir, polipéptido 1 = polipéptido 2) es más fácil y más rentable de generar y purificar que un dímero con dos restos diferentes. Los dominios de unión a albúmina sérica humana son necesarios en diversos casos para extender la semivida del constructo. Sin embargo, tener un dominio

de unión a albúmina sérica humana adicional no debe tener ningún efecto negativo sobre el perfil PK del constructo.

7.1 Radiomarcaje de polipéptidos

5 Se sometieron a prueba las propiedades PK mediante polipéptidos radiomarcados. En resumen, se radiomarcaron polipéptidos con ^{89}Zr , NCS-Bz-Df mediante conjugación al azar en $-\text{NH}_2$ libre (véase la figura 12). Se mezclaron 22 nmol (1,0 mg) de polipéptido con NaCl al 0,9% hasta un volumen final de 500 μl (concentración final de 2 mg/ml). Luego, se ajustó el pH a 8,9-9,1 añadiendo Na_2CO_3 0,1 M. Finalmente, se añadió una disolución de 66 nmol de NCS-Bz-Df en DMSO (3 eq., 10 μl) y se hizo reaccionar durante 30 min a 37°C. Después de 30 min, se purificó la mezcla de reacción usando una columna PD10 lavada previamente con NaOAc 50 mM/sacarosa 200 mM. Se recogió el producto en una fracción de 1,0 ml. A continuación se radiomarcaron los polipéptidos Df-PK con ^{89}Zr a pH ~ 7 durante 60 min a temperatura ambiente (la mezcla de reacción contenía: 100 μl de ácido oxálico 1 M que contenía ^{89}Zr , 45 μl de Na_2CO_3 2 M, 500 μl de tampón Hepes 0,5 M (pH 7,2) y 355 μl de polipéptido NCS-Df ($\sim 0,4$ mg)). A continuación, se purificó la mezcla de reacción sobre una columna PD10 lavada previamente con NaOAc 50 mM/sacarosa 200 mM y se recogió el producto en 1,5 ml.

Tabla 8 Resultados de marcaje de polipéptidos

Polipéptido	rendimiento de radiomarcaje (MBq)	rendimiento de radiomarcaje (%)	Filtro Spinfilter (%)	HPLC (%)	Unión de Lindmo
^{89}Zr -T023800001	5,484	19,2	87,7	91,4	95,0
^{89}Zr -T023800006A	2,742	9,6	97,7	96,4	95,5
^{89}Zr -T023800006-MMAE	10,878	37,6	98,2	100	90,6

20 Se resumen los resultados de radiomarcaje en la tabla 8. Los rendimientos de radiomarcaje variaron entre el 9,6% y el 37,6% (normalmente se espera un rendimiento de radiomarcaje del 70%). Probablemente este bajo rendimiento de marcaje tiene que ver con la baja cantidad de polipéptido que se usó durante la modificación. El análisis mediante HPLC y Spinfilter mostró que la pureza radioquímica fue satisfactoria para ^{89}Zr -T023800006A y ^{89}Zr -T023800006-MMAE (> 96%). ^{89}Zr -T023800001 mostró una pureza <90,0% para el análisis con filtro Spinfilter, la HPLC mostró el 8,6% de ^{89}Zr libre. Normalmente, un constructo debe tener una pureza de radiomarcaje > 90,0%. En este caso, se decidió usar ^{89}Zr -T023800001 de todos modos para el estudio PK, puesto que la pureza con filtro Spinfilter de ^{89}Zr -T023800001 está cerca del 90% y el análisis mediante HPLC muestra un producto > 90% puro. La unión de Lindmo fue > 90% para todos los polipéptidos (datos no mostrados).

30 Posteriormente, se formularon polipéptidos radiomarcados con ^{89}Zr -PK con una actividad de 0,22 MBq/ratón, concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con un volumen de inyección de 130 μl .

35 En conclusión, los rendimientos de radiomarcaje no fueron tan eficientes como se esperaba. La pureza radioquímica de ^{89}Zr -T023800006A y ^{89}Zr -T023800006-MMAE fue buena (> 97% según el filtro Spinfilter y > 96% según la HPLC). Los resultados de unión de Lindmo fueron altos, con > 90%. ^{89}Zr -T023800001 no fue tan puro como se requería con el análisis con filtro. Finalmente, se decidió seguir usando ^{89}Zr -T023800001. Se formularon todos los polipéptidos y se inyectaron satisfactoriamente.

7.2 Estudios PK in vivo

40 Se les inyectó a 3 ratones polipéptido radiomarcado (^{89}Zr) y se detectaron los valores de cpm (cuentas por minuto) en 9 puntos de tiempo: 5 min, 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 140 h, 168 h y 192 h. Luego se usaron estos valores para calcular el % de dosis inyectada de polipéptido por g de ratón (% de DI/g). Para cada polipéptido, se promediaron los resultados de los 3 ratones.

45 Se resumen los resultados en la figura 13.

50 Los resultados muestran inesperadamente que el perfil de biodistribución de polipéptidos bivalentes (T-023800006-A) es similar al perfil de biodistribución de los polipéptidos conjugados con fármaco (T-023800006-MMAE). La conjugación de un polipéptido de la invención con una carga útil no tiene ningún efecto sobre el perfil de biodistribución. Sin limitarse a ninguna teoría, se planteó la hipótesis de que el proceso de conjugación controlado estrechamente que da como resultado una RFA = 1 es predictivo de las propiedades PK (en este caso, no hay variación en comparación con los polipéptidos no conjugados).

55 También inesperadamente, el perfil de biodistribución del dímero ligado a cys de la invención (T-023800001) es similar al de un polipéptido bivalente correspondiente (T-023800006-A). La presencia de dos unidades de unión de albúmina

sérica humana en el dímero ligado a cys de la invención no afecta el perfil de distribución.

8 Internalización mejorada por dímeros

5 El objetivo de este experimento era evaluar si un dímero ligado a Cys DIM T023800001 (es decir, bivalente desde una perspectiva funcional) muestra una internalización aumentada en comparación con su homólogo monomérico (T023800001-A) y el formato bivalente de fusión genética ligado tradicionalmente (T023800006-A). Con este propósito, se realizó un experimento de internalización en células NCI-H292, que expresan moderadamente el receptor de EGF. Se midió la acumulación de Nanobodies internalizados en células vivas mediante citometría de flujo (FCM, por sus siglas en inglés) usando una albúmina marcada con pHrodo™ (50 µg/ml) como herramienta de detección. El colorante pHrodo® es una sonda molecular sensible al pH y casi no fluorescente a pH neutro. En entornos ácidos tal como en los endosomas y lisosomas, fluoresce de manera brillante. Se transfirieron células (30.000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante 5 h a 37°C con diferentes concentraciones de los polipéptidos y constructos particulares junto con la albúmina marcada con pHrodo™ (50 µg/ml). Entonces se lavaron las células, se recogieron, se midieron con FCM y se analizaron.

Las curvas dosis-respuesta obtenidas se presentan en la figura 14 y los valores de CE₅₀ correlacionados y los niveles superiores de los MFI superiores se enumeran en la tabla 9.

20 Tabla 9. Valores de CE₅₀ estimados y niveles superiores de MFI

	CE ₅₀ (nM)	MFI superiores
DIM T023800001	0,7	42102
T023800001-A	> 23	No alcanzado
T023800006-A	> 16	No alcanzado

25 Sorprendentemente, en las células NCI-H292, la internalización general de DIM T023800001 pareció ser más potente y eficaz que la del monómero T023800001-A y el Nanobody bivalente ligado tradicionalmente T023800006-A. Además, esta diferencia en la internalización es menos pronunciada pero todavía significativa en las células que expresan EGFR en niveles extremadamente altos tales como MDA-MB-468 (datos no mostrados).

REIVINDICACIONES

1. Método para producir dímeros, que comprende al menos las etapas de:
 - 5 (i) proporcionar un primer polipéptido, en el que dicho primer polipéptido comprende
 - al menos un VHH y
 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína;
 - 10 (ii) proporcionar un segundo polipéptido, en el que dicho segundo polipéptido comprende
 - al menos un VHH y
 - 15 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína; y
 - 20 (iii) oxidar el resto de tiol de dicho resto de cisteína de dicho primer polipéptido y el resto de tiol de dicho resto de cisteína de dicho segundo polipéptido a un pH de 6,5 a un pH de 7,5 a un derivado de disulfuro cistina;
 - 25 caracterizado porque se mantiene la integridad de los VHH y dicha cistina es el único enlace disulfuro intermolecular presente en el dímero; produciéndose de ese modo dichos dímeros.
2. Método según la reivindicación 1, en el que al menos el 80% de dicho primer y dicho segundo polipéptidos están dimerizados.
- 25 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de purificar dichos dímeros.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido son idénticos.
- 30 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido son diferentes.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende una extensión C-terminal de 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 residuo(s) de aminoácido que comprende(n) un resto de cisteína.
- 35 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha extensión C-terminal se fusiona genéticamente al extremo C-terminal del VHH ubicado de la manera más C-terminal en dicho polipéptido.
- 40 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende un resto de cisteína en el extremo C-terminal.
9. Dímero que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido,
 - 45 en el que dicho primer polipéptido comprende
 - al menos un VHH y
 - 50 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína;
 - en el que dicho segundo polipéptido comprende
 - al menos un VHH y
 - 55 - una extensión C-terminal que comprende un resto de cisteína; y
 - en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido se unen covalentemente a través de un enlace disulfuro entre el resto de cisteína de dicho primer polipéptido y el resto de cisteína de dicho segundo polipéptido; y dicho enlace disulfuro entre el resto de cisteína en la extensión C-terminal de dicho primer polipéptido y el resto de cisteína en la extensión C-terminal de dicho segundo polipéptido es el único enlace disulfuro intermolecular presente en el dímero.
- 60 10. Dímero según la reivindicación 9, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende una extensión C-terminal de 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 residuo(s) de aminoácido que comprende(n) un resto de cisteína.
- 65

11. Dímero según la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido son idénticos.
- 5 12. Dímero según la reivindicación 9 ó 10, en el que dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido son diferentes.
13. Dímero según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende además un fármaco.
- 10 14. Dímero según la reivindicación 13, en el que dicho fármaco se elige del grupo que consiste en agentes citostáticos, agentes citotóxicos, agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas, restos de toxina e isótopos radiactivos.
- 15 15. Dímero según la reivindicación 13 ó 14, en el que la razón de fármaco con respecto a dímero (RFA) es de 1.
16. Dímero según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en el que dicho primer polipéptido y/o dicho segundo polipéptido comprende un resto de cisteína en el extremo C-terminal.
- 20 17. Dímero según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, para su uso en el tratamiento de cáncer, en el que dicho dímero se internaliza.

Figura 1: Constructos

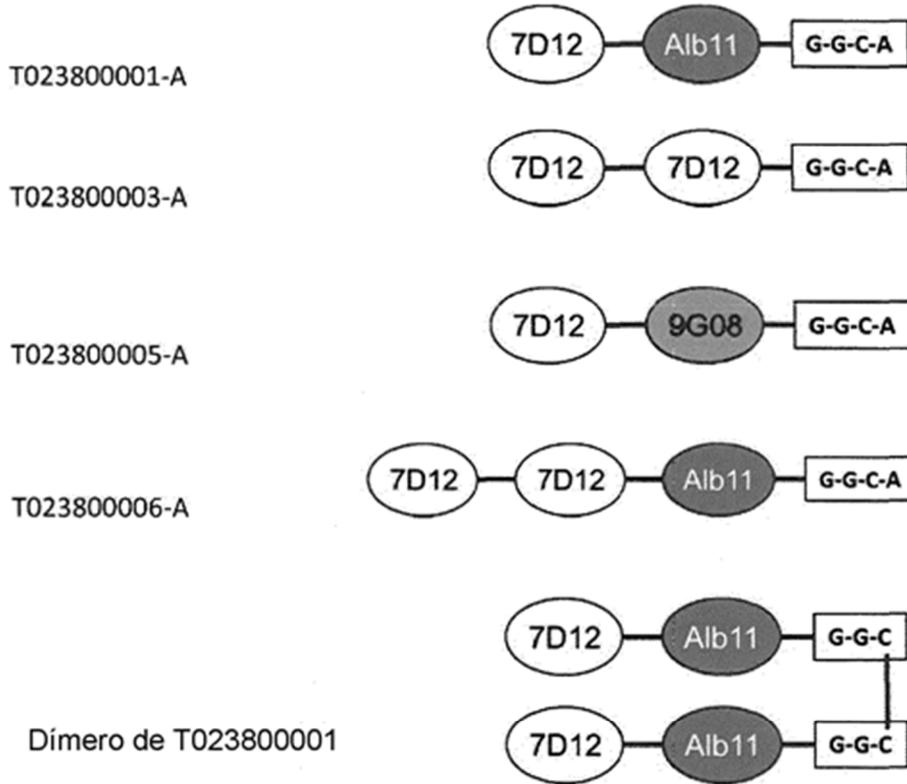


Figura 2

FACS de unión competitiva

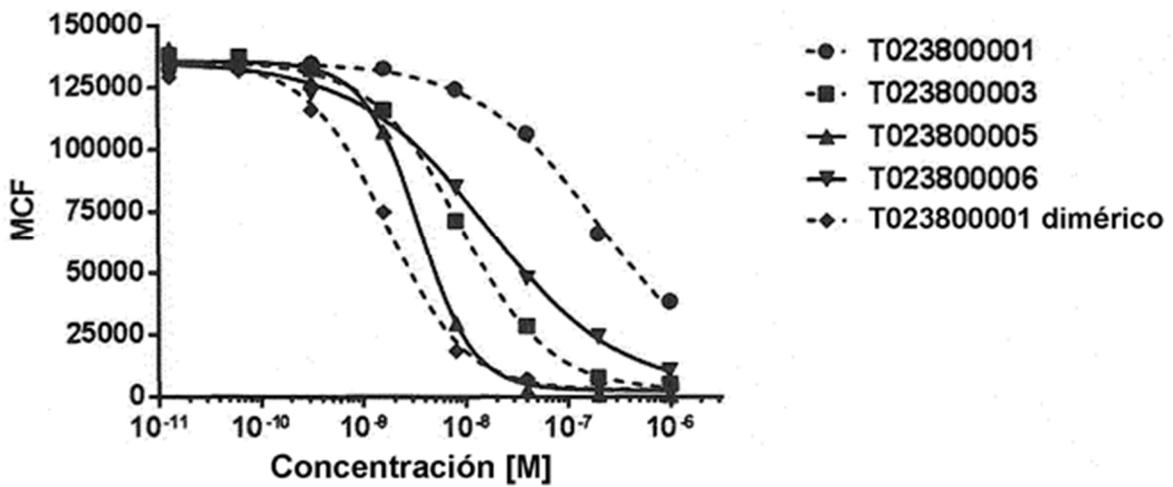


Figura 3

Bloqueo de la fosforilación de EGFR mediada por EGF

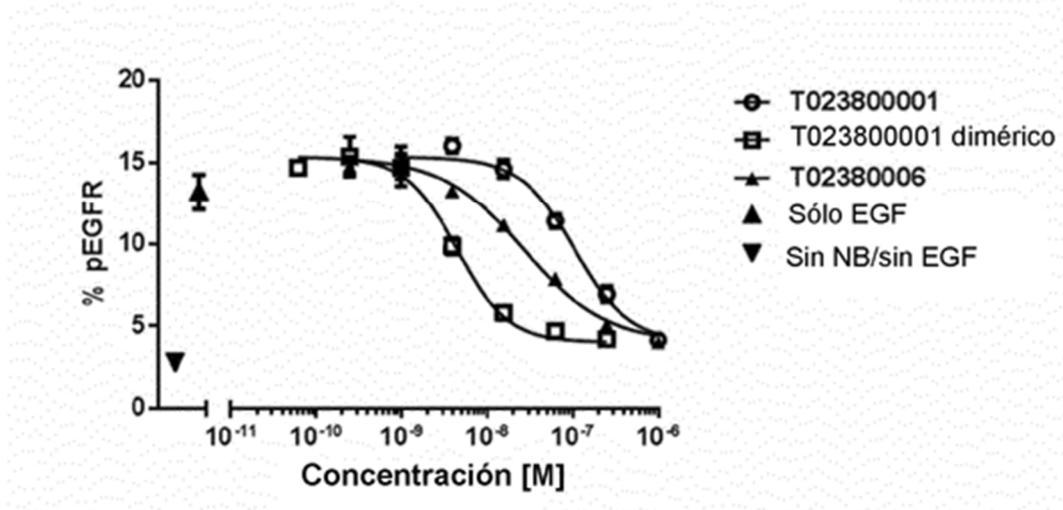


Figura 4

Esquema de reducción de dímero

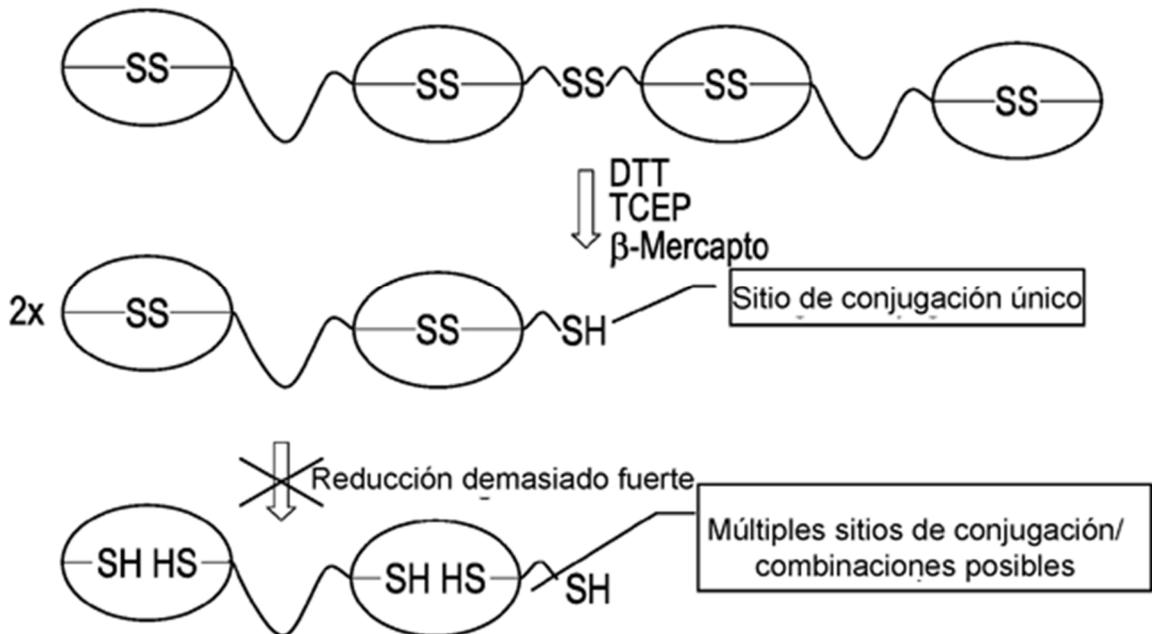


Figura 5

Perfil de SEC de polipéptidos extendidos con cistena reducidos

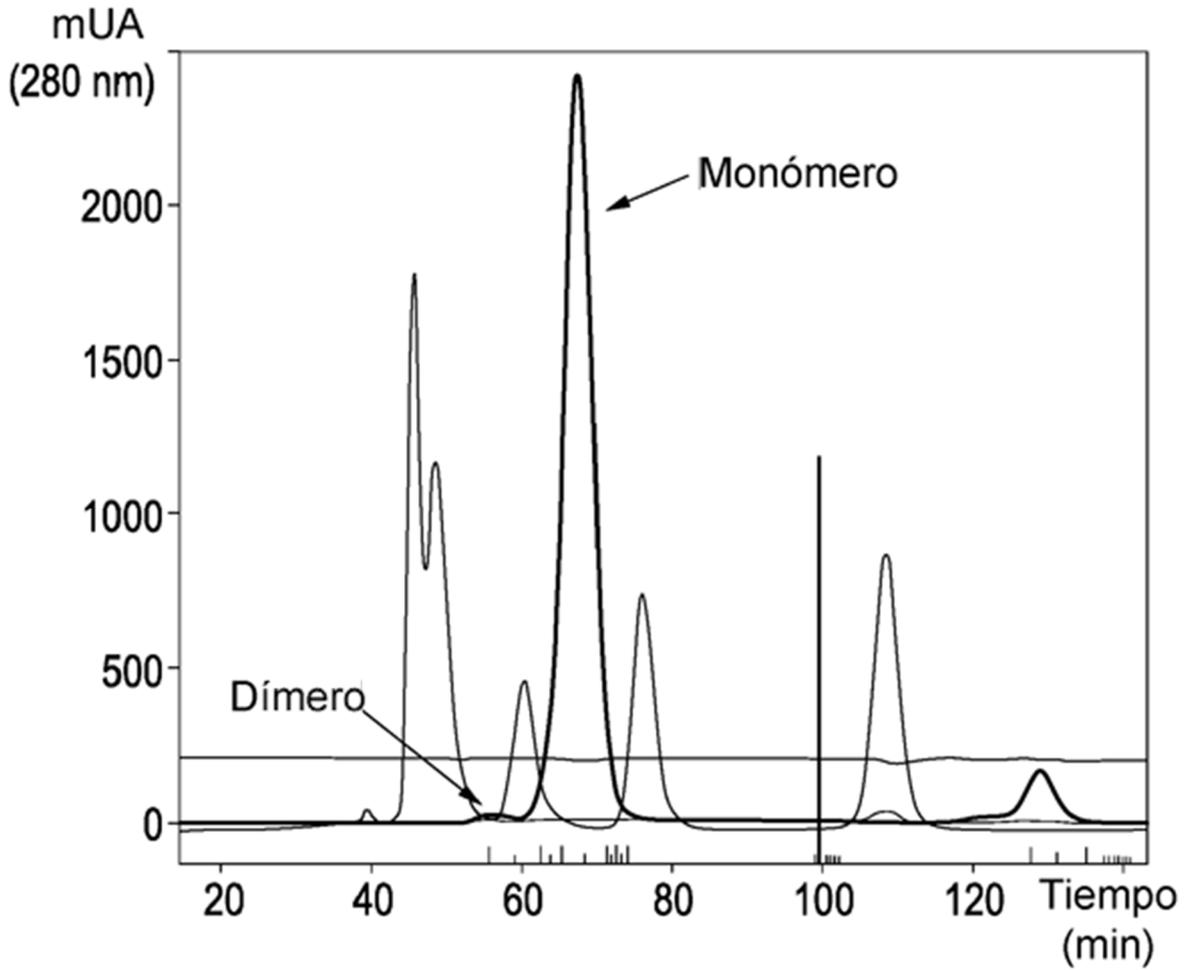


Figura 6

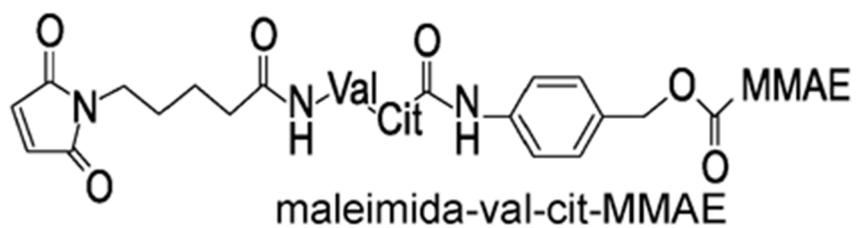


Figura 7:

Análisis mediante SDS-PAGE de T0238-00001-mc-val-cit-PAB-MMAE (ABL100-NC003-1)

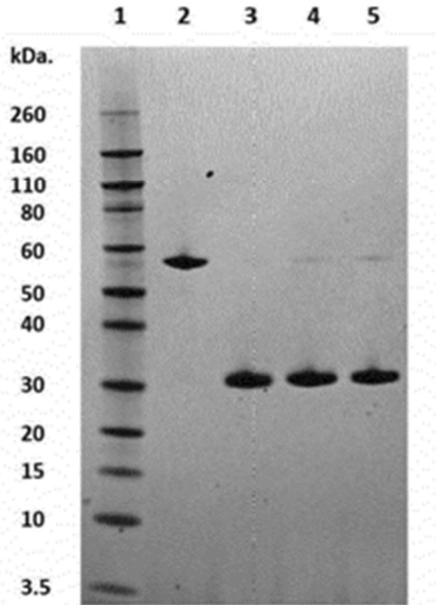


Figura 8:

Cromatogramas de interacción hidrófoba superpuestos

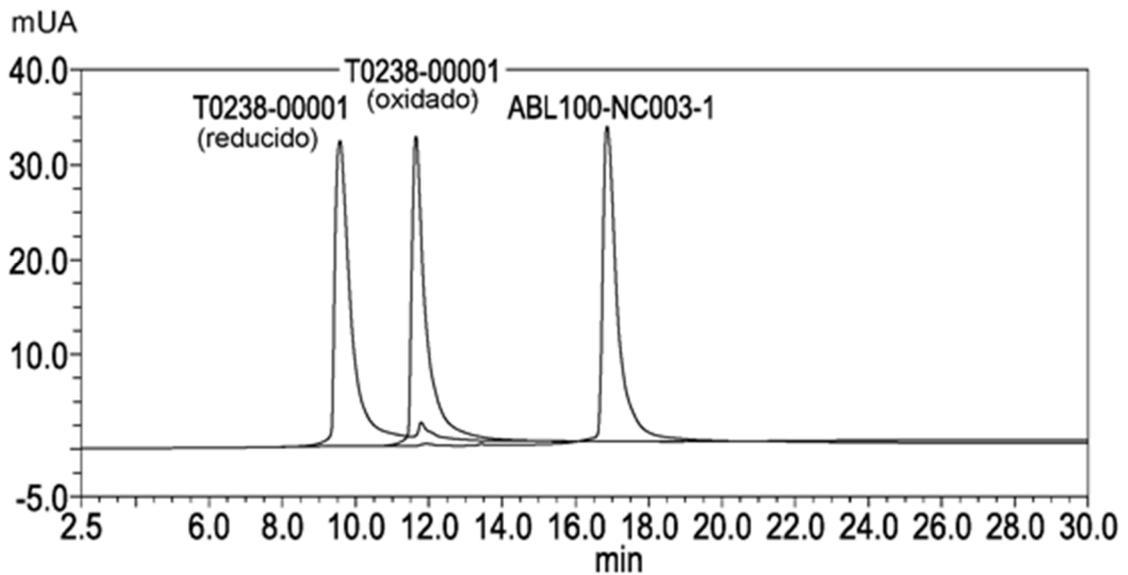


Figura 9:

Destrucción celular *in vitro* de conjugados polipéptido-MMAE

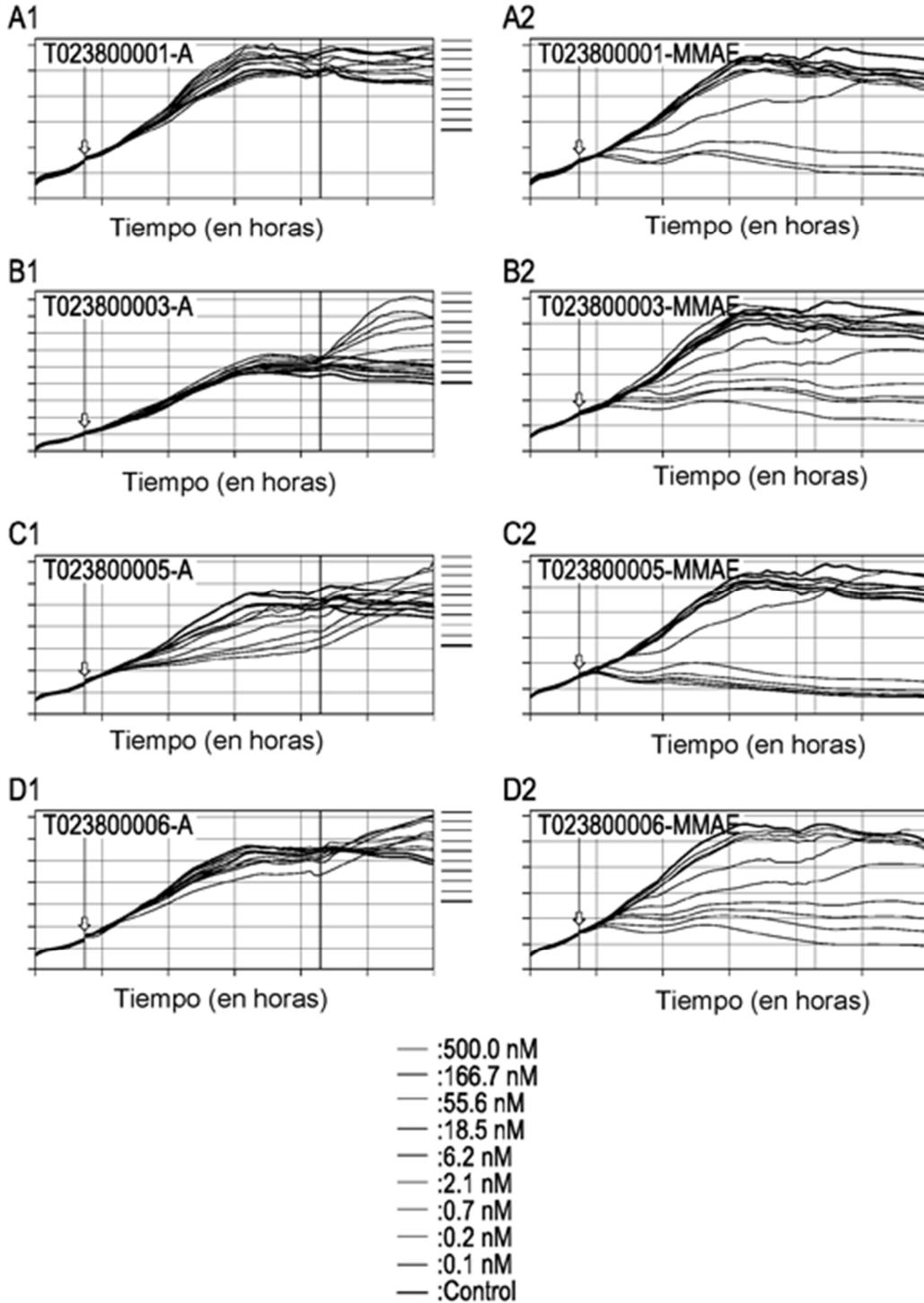


Figura 10: Efecto dependiente de la dosis de los polipéptidos no conjugados y conjugados con MMAE

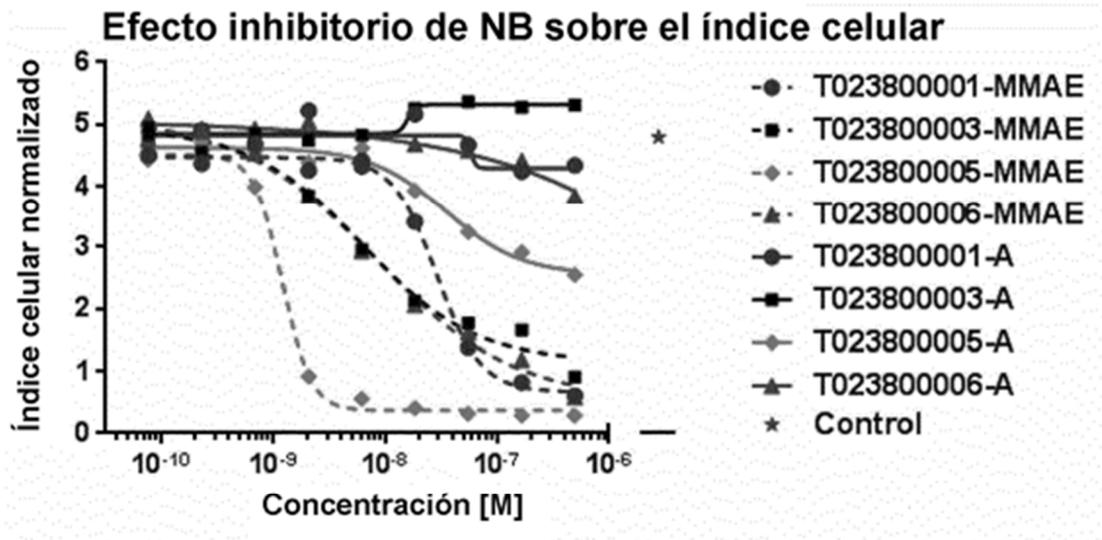


Figura 11:
Eficacia *in vivo* de los conjugados polipéptido-MMAE

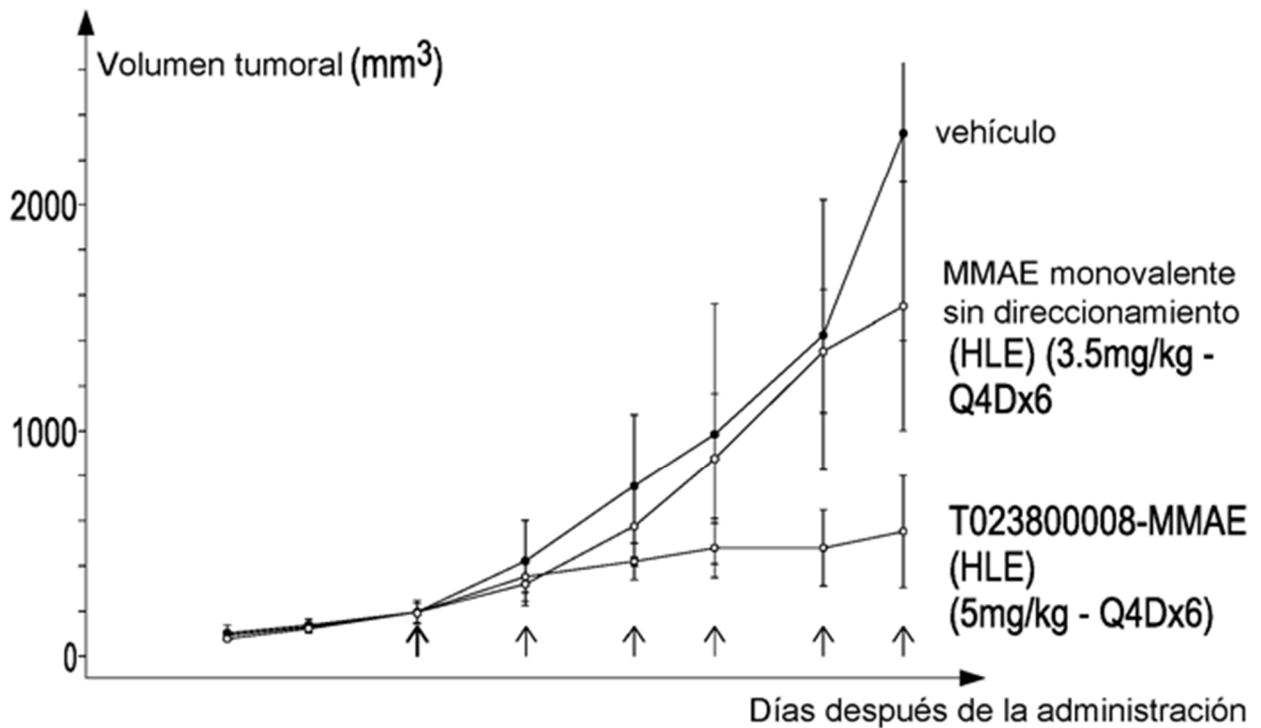


Figura 12 Modificación y radiomarcaje de Nb usando NCS-Bz-Df y ^{89}Zr

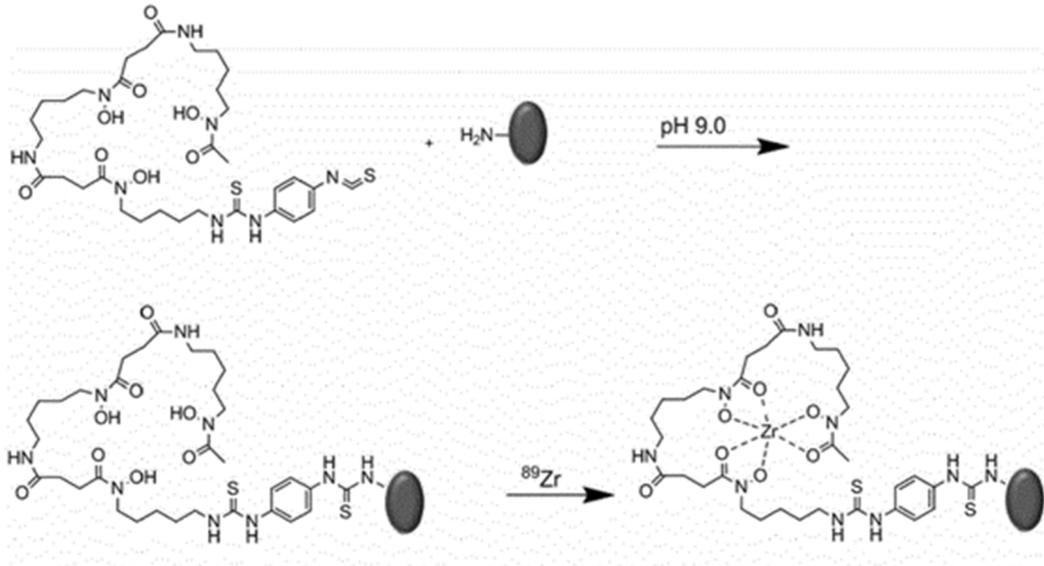


Figura 13:
% de ID/g promediado para 3 polipéptidos

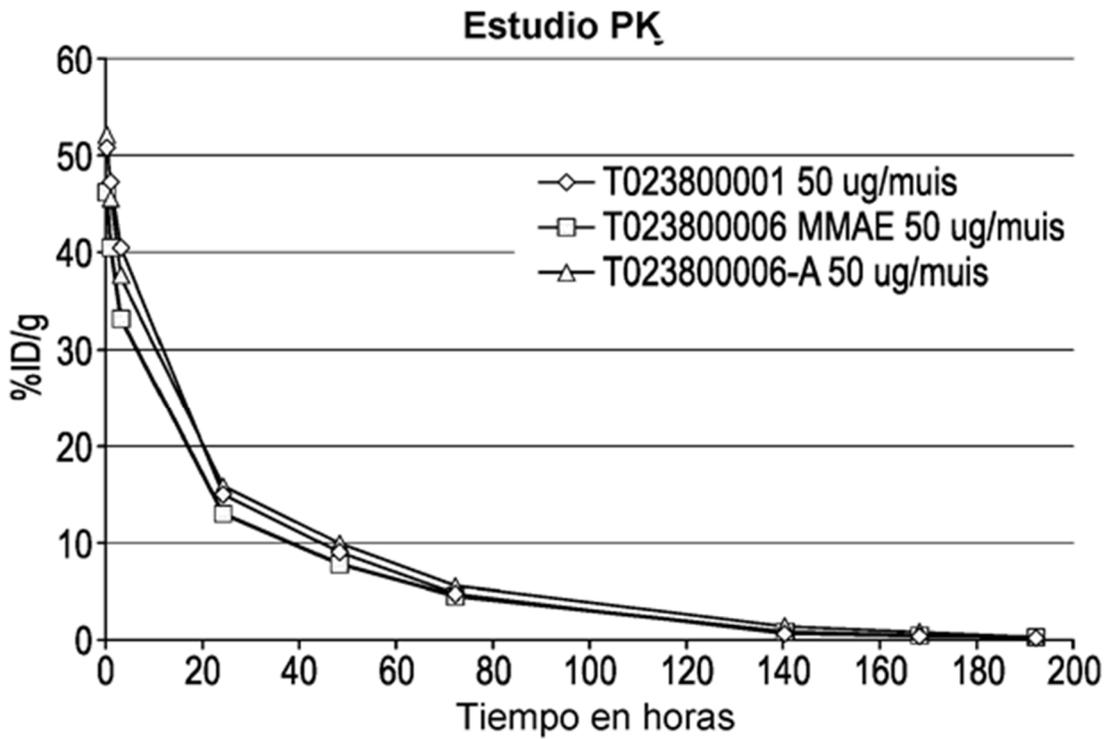


Figura 14 Curva dosis-respuesta de constructos y polipéptidos internalizados

