

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 815**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/14 (2006.01)

C07K 14/39 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2015 PCT/EP2015/061819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15181282**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2015 E 15726923 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3149032**

54 Título: **Nuevo formato biespecífico adecuado para su uso en el cribado de alto rendimiento**

30 Prioridad:

29.05.2014 GB 201409558

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

15.12.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FINNEY, HELENE MARGARET;
RAPECKI, STEPHEN EDWARD y
WRIGHT, MICHAEL JOHN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 885 815 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

Nuevo formato biespecífico adecuado para su uso en el cribado de alto rendimiento

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a un método, en particular a un método *in vitro/ex vivo*, para detectar la función biológica sinérgica en un complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente, bibliotecas/múltiplex de los complejos proteicos biespecíficos, y kits y composiciones de los mismos. La divulgación se refiere además a estos
10 novedosos complejos proteicos biespecíficos y al uso de los mismos con fines de terapia, investigación y experimentales (en particular en ensayos que buscan una función biológica sinérgica). La presente divulgación se extiende también a métodos para preparar dichos complejos biespecíficos.

Antecedentes de la invención

15 Los mecanismos biológicos *in vivo* son cascadas de señales extremadamente complicadas, que son difíciles de desentrañar y comprender. Un ejemplo de dicha señalización es aquella que se requiere para activar células T, véase la Figura 1, de www.cellsignal.com. La activación de células T requiere al menos dos señales.

20 El reconocimiento del antígeno por parte del receptor de células T se considera la primera señal y la segunda señal surge a partir de la coestimulación que resulta de la ligadura de moléculas de la superficie adicionales en la célula T con moléculas adicionales una célula presentadora de antígenos.

25 De este modo, la activación de células T puede usarse para ilustrar que la modulación de las funciones biológicas puede requerir señales múltiples. Otros procesos biológicos son igualmente complicados o más complicados. Pese a que el cribado *in vitro* basado en células ha ayudado y puede ayudar a adquirir conocimiento sobre los mecanismos *in vivo*, sigue planteándose el problema de cómo identificar pares de ligandos adecuados que modulen la función biológica.

30 Se espera ampliamente que los anticuerpos biespecíficos desempeñen un papel importante en la siguiente generación de bioterapéuticos (D. Holmes, Nature Rev Drug Disc, nov de 2011:10; 798). Tienen el potencial de ofrecer una eficacia superior, a largo plazo y amplia en una mayor proporción de pacientes.

35 Esto puede lograrse ya sea coacoplando diferentes antígenos simultáneamente dentro de una vía de enfermedad común, reduciendo así la redundancia; o al direccionar antígenos desde vías independientes para proporcionar un efecto aditivo o sinérgico.

Los anticuerpos biespecíficos facilitan el acceso a una biología novedosa, tal como:

- 40 1) reticular receptores en una célula,
- 2) inducir efectos mediados por células,
- 3) localizar una citocina en una célula para regular la señalización o bloquear localmente la función de la citocina,
- 4) acoplar múltiples epítomos simultáneamente para generar una "nueva actividad", aumentar la función o la especificidad, que puede no ser exhibida por un solo anticuerpo monoclonal o, de hecho, mezclas de anticuerpos
45 no enlazados ("polimonoclonales").

Las estrategias actuales para acoplar dianas dobles se basan en gran medida en el diseño racional de mecanismos conocidos e incluyen: reticulación de receptores inhibidores, coacoplamiento/agrupamiento de receptores, bloqueo de
50 múltiples vías estimuladoras, acoplamiento selectivo de receptores inhibidores y bloqueo de distintas vías, tales como coestimulación y señalización de citocinas.

Sin embargo, el actual estado de la técnica con respecto a los mecanismos y dianas conocidos es un factor limitante del progreso en esta área.

55 Pese a que los anticuerpos biespecíficos tienen un enorme potencial como terapéuticos biológicos, también presentan un mayor conjunto de desafíos en el descubrimiento y desarrollo en comparación con los anticuerpos monoclonales. Dos áreas clave de dificultad son, 1) el desarrollo de un formato de anticuerpo biespecífico exitoso, y 2) la selección de los pares de dianas a los que el anticuerpo biespecífico se reticulará o coacoplará.

60 En la actualidad se han desarrollado muchos formatos de anticuerpos biespecíficos prometedores que podrían funcionar potencialmente como terapéuticos exitosos, incluyendo DVD-Ig (Abbvie), DuoCuerpos (Genmab), Botón en ojal (Genentech), Cadena ligera común (Merus). Sin embargo, en cada uno de estos casos, estos formatos no son idealmente adecuados para el cribado de descubrimiento de antígenos de doble diana de alto rendimiento con el fin de permitir el descubrimiento de novedosos pares de antígenos para reticulación con anticuerpos biespecíficos.

65 Normalmente, para una única construcción de anticuerpo biespecífico, es necesario subclonar al menos dos regiones

variables a partir de la fuente original de vectores de descubrimiento (por ejemplo, expresión en fago, hibridoma o clonación de células B individuales) en vectores de expresión biespecíficos adecuados, cada brazo del biespecífico tiene que ser expresado y el anticuerpo biespecífico resultante purificado. Esta clonación y posterior esfuerzo de expresión se convierte rápidamente en un cuello de botella práctico significativo si se desea combinar un gran número de pares de regiones variables en un intento por cribar la combinación más eficaz de regiones variables descubiertas o por descubrir novedosos pares de antígenos.

Por ejemplo, si se descubren 50 anticuerpos únicos contra un panel de 50 dianas en la superficie celular, entonces un total de 2500 anticuerpos biespecíficos podrían generarse potencialmente (contemplado como una cuadrícula X por Y). Con los formatos de anticuerpos biespecíficos descritos anteriormente, esto requeriría al menos 100 reacciones de clonación individuales (50-X y 50-Y) seguidas de 2500 experimentos de expresión de anticuerpos. Aumentar el número de anticuerpos monoclonales de partida a 100, aumentaría el número mínimo de reacciones de clonación a 200 (100-X y 100-Y) y el número de expresión a 10.000.

En general, la causa fundamental de este "cuello de botella de expresión" es el hecho de que los formatos descritos anteriormente requieren que ambas "mitades" de cadenas proteicas de la construcción biespecífica final se expresen simultáneamente en un único experimento de expresión en la misma célula. Por lo tanto, para muchos formatos, para producir 2500 anticuerpos biespecíficos, se requieren 2500 experimentos de expresión.

El "cuello de botella de expresión" se exagera aún más si el formato de anticuerpo biespecífico es monocistrónico (es decir, clonado y expresado como una proteína monocatenaria), por ejemplo, diacuerpos monocatenarios, ya que el número de experimentos de clonación sería de 2500 y 10.000 respectivamente para los números indicados anteriormente.

Asimismo, después de la expresión, puede requerirse una amplia purificación para aislar la construcción deseada.

Algunos enfoques biespecíficos emplean una cadena ligera común en las construcciones biespecíficas con el fin de reducir la cantidad de clonación, aunque esto no reduce el número de experimentos de expresión. Asimismo, usando una cadena común, tal como una cadena ligera común, se dificulta aún más el desafío del descubrimiento de anticuerpos, ya que es más difícil encontrar los dominios variables del anticuerpo de partida, puesto que el anticuerpo necesita unirse a su antígeno con una afinidad suficientemente alta a través de una cadena, tal como la cadena pesada, únicamente.

Por consiguiente, el uso de formatos biespecíficos actuales en el cribado a gran escala y de alto rendimiento para identificar novedosos pares de antígenos es poco práctico y ha llevado al uso continuado de enfoques únicamente basados en hipótesis para el direccionamiento de antígenos biespecíficos.

Se propone que, en lugar de diseñar y analizar una selección limitada de anticuerpos biespecíficos que acoplan determinados epítomos en dos dianas conocidas, el verdadero potencial de explotar el acceso a la biología novedosa con anticuerpos biespecíficos solo se puede lograr a través de un esfuerzo de cribado funcional amplio con un gran panel combinatorio y diverso de anticuerpos biespecíficos o ligandos de proteínas. Para facilitar este cribado se requiere un formato y un método que permita generar un gran número de diversas proteínas biespecíficas que puedan construirse y cribarse con facilidad en busca de efectos funcionales en una variedad de cribados funcionales. Este enfoque permite la identificación fortuita de pares sinérgicos.

Por tanto, sería útil generar y cribar un gran número de complejos proteicos biespecíficos presentes como combinaciones de varias especificidades de antígeno. En particular, sería útil poder generar y cribar un gran número de complejos de anticuerpos biespecíficos diferentes de forma rápida y eficaz. Hay una serie de métodos existentes para la fabricación de anticuerpos biespecíficos, como ya se ha descrito anteriormente. Sin embargo, cada uno de estos métodos tiene sus desventajas, al igual que los métodos alternativos como se describe adicionalmente en más detalle a continuación.

El problema de cómo identificar eficazmente las dianas para las construcciones biespecíficas y multiespecíficas no se ha abordado adecuadamente en la técnica. Por ejemplo, el documento WO2014/001326 emplea la conjugación química de una proteína con un fragmento de ADN, en donde el fragmento de ADN se hibrida con una secuencia de ADN complementaria que enlaza dos de estas proteínas entre sí para generar moléculas multiespecíficas específicas para el paciente personalizadas que comprenden al menos dos entidades de direccionamiento.

Existe un número de dificultades asociadas con este enfoque si se aplicase a la identificación de nuevas combinaciones biespecíficas, por ejemplo, la conjugación de la proteína con el ADN puede acarrear daños a la actividad y/o a la estructura de la proteína. En particular, los híbridos proteína-ADN no se producen de forma natural, por lo que existe un potencial de interferencia. Además, la conjugación química requerida para unir la proteína y el ADN añade complejidad, tiempo y gastos al proceso.

Existen técnicas de acoplamiento y conjugación para generar conjugados de anticuerpo y fármaco y tecnologías de direccionamiento *in vivo*. La reticulación química tradicional requiere mucho trabajo, ya que puede ser necesario

purificar las especies relevantes a partir de homodímeros y otros subproductos indeseables. Adicionalmente, las etapas de modificación química pueden alterar la integridad de las proteínas, lo que conduce a una estabilidad deficiente o a una función biológica alterada. Como resultado, la producción de anticuerpos biespecíficos por reticulación química es a menudo ineficiente y también puede conducir a una pérdida de actividad del anticuerpo.

Otro método de fabricación de anticuerpos biespecíficos es mediante fusión celular (por ejemplo, hibridomas híbridos), en donde las células genomanipuladas expresan dos cadenas de anticuerpo pesadas y dos ligeras que se ensamblan aleatoriamente. Dado que hay 4 variantes posibles a seleccionar, esto da como resultado la generación de 10 combinaciones de anticuerpos biespecíficos posibles, de las cuales solo algunas combinaciones (en muchos casos, solo una) serían deseadas. Así pues, generar anticuerpos biespecíficos mediante fusión celular da como resultado bajos rendimientos de producción y también requiere de una etapa de purificación adicional con el fin de aislar los anticuerpos biespecíficos deseados de los otros anticuerpos biespecíficos producidos. Estas desventajas aumentan el tiempo y los costes de fabricación.

También se han empleado técnicas de ADN recombinante para generar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, también se han utilizado técnicas de ADN recombinante para generar anticuerpos biespecíficos de "botón en ojal". La técnica de "botón en ojal" implica modificar por ingeniería genética mutaciones estéricamente complementarias en dominios de multimerización en la interfaz del dominio CH3 (véase, por ejemplo, Ridgway *et al.*, Protein Eng. 9:617-621 (1996); Merchant *et al.*, Nat. Biotechnol. 16(7): 677-81 (1998); véanse también las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.731.168 y 7.183.076). Una de las limitaciones de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos parentales tienen que ser idénticas para evitar que se produzca un emparejamiento erróneo y la formación de moléculas no deseadas y/o inactivas cuando se expresan en la misma célula. Cada biespecífico (cadenas pesada y ligera del mismo) debe expresarse en una sola célula y el producto proteico contiene aproximadamente en general un 20 % de homodímero, que se elimina posteriormente por purificación.

Otros enfoques se basan en el intercambio natural de cadenas en moléculas de IgG4 de longitud completa (Genmab Dubody). Sin embargo, este enfoque también tiene dificultades porque no permite preparar una construcción sin una región Fc. Ya que la región Fc puede contribuir a la actividad biológica, puede ser difícil establecer si una actividad observada se basa en la combinación de regiones variables, el Fc o ambos en las moléculas biespecíficas que incluyen un Fc. Asimismo, el intercambio es un proceso dinámico y esto puede dar lugar a dificultades en relación con lo que es realmente la entidad analizada.

Finalmente, en el documento WO 93/11162 se ha descrito un enfoque de cremalleras de leucina. Se creó un anticuerpo biespecífico que comprendía un Fab anti-Tac enlazado a la cremallera de leucina de jun (anti-Tac-Jun) y un anti-CD3 enlazado a la cremallera de leucina de fos (anti-CD3-Fos) mediante la asociación por pares de fos y jun, dando lugar a la formación de un dímero F(ab'-cremallera)₂ biespecífico. Dicho enfoque, sin embargo, sufre el inconveniente de que junto con los heterodímeros, también se formarán homodímeros mono-específicos (jun-jun o fos-fos).

De esta manera, existe una necesidad de nuevos métodos para generar complejos proteicos biespecíficos que permitan un cribado más eficiente y de mayor rendimiento de los anticuerpos biespecíficos. En particular, existe una necesidad de un formato y un método en donde una selección de cualesquiera dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de un grupo de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo disponibles pueda combinarse con facilidad para producir eficazmente un múltiplex de diferentes anticuerpos biespecíficos, si bien, por ejemplo, se evite o minimice la formación de homodímeros. El ensamble de anticuerpos biespecíficos diferentes de forma eficiente es particularmente importante cuando se criba una función biológica sinérgica para nuevas combinaciones de especificidades de antígenos, en particular cuando los heterodímeros son esenciales para descubrir esa función.

Sumario de la invención

En un aspecto se proporciona un nuevo formato biespecífico particularmente adecuado para su uso en el cribado puesto que todos los componentes pueden expresarse a partir de una célula como unidades individuales, esencialmente sin agregación y las unidades pueden ensamblarse simplemente mezclando sin emplear química de conjugación o acoplamiento y con una mínima homodimerización.

De este modo, se proporciona un complejo proteico biespecífico que tiene la fórmula A-X:Y-B, en donde:

A-X es una primera proteína de fusión;

Y-B es una segunda proteína de fusión;

X:Y es un enlace heterodimérico;

en donde X se selecciona independientemente de scFv, o un péptido, con la condición de que, cuando X es un péptido, Y es un scFv y, cuando X es un scFv, entonces Y es un péptido;

en donde X o Y es un scFv específico para el péptido GCN4 representado por la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1; en donde el scFv se designa 52SR4 y está representado por la SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3 y en donde X o Y es un péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1).

Así pues, en la presente invención, la variable X o Y es el scFv 52SR4 (SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3) y la otra variable de X e Y es el péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1).

- 5 De esta manera, el formato biespecífico comprende dos brazos Fab con diferentes especificidades enlazadas, por ejemplo a través de su extremo C-terminal, por una interacción de unión a scFv y péptido. Este tipo de disposición es ideal para su uso en el cribado debido a que no hay dificultad para expresar la unidad AX o la unidad B-Y. El fragmento Fab/Fab' es muy estable y no es susceptible a dimerización inadecuada. De este modo, la cantidad de purificación requerida después de la expresión de cada unidad (A-X o B-Y) es mínima o, de hecho, innecesaria. El complejo biespecífico puede formarse en una relación molar 1:1 simplemente mezclando las unidades pertinentes, es decir, sin recurrir a la química de conjugación y acoplamiento. Las regiones constantes en el fragmento Fab/Fab' estimulan la dimerización de los componentes Fab/Fab' y los compañeros de unión X e Y impulsan el equilibrio a favor de la formación del complejo biespecífico heterodímero requerido. De nuevo, muy poca o ninguna purificación se requiere tras la formación del complejo después de la heterodimerización. De este modo, se puede preparar y combinar con facilidad un gran número de A-X y B-Y.

Las entidades Fab/Fab' en el complejo significan que los dominios de unión se mantienen en orientaciones biológicamente relevantes que imitan la geometría clásica del anticuerpo y esto puede contribuir al éxito de la traducción de los pares de regiones variables identificadas por el método de cribado descrito a continuación en otros formatos terapéuticos biespecíficos que conservan la actividad. La capacidad de preparar y cribar un complejo biespecífico que carece del fragmento Fc CH2-CH3 también garantiza que la actividad biológica observada se deba, de hecho, únicamente a los pares de la región variable en el complejo. La simplicidad del complejo biespecífico de la invención y los métodos para prepararlo son una gran ventaja en el contexto de facilitar el cribado de alto rendimiento de pares de dominios variables para encontrar nuevas combinaciones de antígenos diana y también para optimizar las secuencias de la región variable para una combinación dada.

En una realización, A es un fragmento Fab. En una realización, B es un fragmento Fab. En una realización, A y B son ambos un fragmento Fab (también denominado en el presente documento Fab-Kd-Fab).

- 30 En una realización, X se fusiona al extremo C-terminal de una cadena pesada o cadena ligera en el fragmento Fab o Fab', en particular, al extremo C-terminal de la cadena pesada.

En una realización, Y se fusiona al extremo C-terminal de una cadena pesada o cadena ligera en el fragmento Fab o Fab', en particular, al extremo C-terminal de la cadena pesada.

- 35 X se selecciona independientemente del scFv 52SR4 y el péptido GCN4, con la condición de que cuando X es el péptido Y es el scFv y cuando X es el scFv entonces Y es el péptido.

- 40 En una realización, Y se selecciona independientemente del scFv 52SR4 y el péptido GCN4, con la condición de que cuando Y es el péptido X es el scFv y cuando Y es el scFv entonces X es el péptido.

En una realización, la afinidad de unión entre X e Y es de 5 nM o superior, por ejemplo, la afinidad de unión del enlace heterodimérico es de 900 pM o superior, tal como 800, 700, 600, 500, 400 o 300 pM.

- 45 En la presente invención, X o Y es un scFv 52SR4 (SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1-243 de la SEQ ID NO:3) específico para el péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1) y el otro de X de Y es el péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO:1).

En una realización, A y/o B es específico para un antígeno seleccionado del grupo que comprende: receptores de superficie celular, tales como los receptores de señalización de células T o células B, moléculas coestimuladoras, inhibidores del punto de control, receptores de linfocitos citolíticos naturales, receptores de inmunoglobulinas, receptores tipo inmunoglobulina, metaloproteasas de matriz e inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz tipo membrana de metaloproteasas, familia de receptores de TNFR, receptores de la familia B7, moléculas de adhesión, integrinas, receptores de citocinas/quimiocinas, GPCRs, receptores del factor de crecimiento, receptores de quinasas, antígenos específicos de tejidos, antígenos de cáncer (antígenos asociados a tumores y péptidos), receptores de reconocimiento de patógenos, receptores del complemento, receptores hormonales, receptores depuradores, o moléculas solubles tales como citocinas, quimiocinas, leucotrienos, factores de crecimiento, hormonas o enzimas o canales iónicos, incluyendo una versión modificada después de la traducción de los mismos, fragmentos de los mismos que comprenden al menos un epítipo.

- 60 En una realización, se proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica que comprende uno o más complejos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación.

Asimismo, la presente divulgación también se refiere a un método que no forma parte de la invención para detectar la función sinérgica en un complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente de la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (i) ensayar la actividad en un ensayo funcional de una parte o la totalidad de un múltiplex que comprende al menos una proteína biespecífica enlazada heterodiméricamente; y
 (ii) analizar las lecturas del ensayo funcional para identificar la función biológica sinérgica en el complejo proteico biespecífico.

El método emplea el novedoso formato de complejo proteico biespecífico de la presente invención que tiene la siguiente fórmula A-X:Y-B, en donde:

A-X es una primera proteína de fusión;
 Y-B es una segunda proteína de fusión;
 X:Y es un enlace heterodimérico;
 : es una interacción de unión entre X e Y;
 A es un primer componente proteico del complejo proteico biespecífico seleccionado de un fragmento Fab o Fab';
 B es un segundo componente proteico del complejo proteico biespecífico seleccionado de un fragmento Fab o Fab';
 en donde X se selecciona independientemente de scFv, o un péptido, con la condición de que, cuando X es un péptido, Y es un scFv y, cuando X es un scFv, entonces Y es un péptido;
 en donde X o Y es un scFv específico para el péptido GCN4 representado por la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1; en donde el scFv se designa 52SR4 y está representado por la SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3 y en donde X o Y es un péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1).

En particular, el complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente se prepara mezclando A-X y B-Y *in vitro*. De este modo, en una realización, el método comprende una etapa de mezcla *in vitro* que pone en contacto a A-X y B-Y.

De este modo, generalmente las proteínas de fusión A-X y B-Y no se coexpresan en la misma célula. Esto es ventajoso porque permite, por ejemplo, que se expresen y opcionalmente se purifiquen 100 proteínas de fusión y que la posterior mezcla de las 100 proteínas de fusión en las diversas permutaciones pueda proporcionar 10.000 complejos proteicos biespecíficos enlazados heterodiméricamente, de los cuales 5000 son pares únicos.

Por el contrario, ciertos métodos de la técnica anterior requieren la coexpresión de los biespecíficos y, por tanto, para 10.000 complejos, 10.000 transfecciones, expresiones y purificaciones son requeridas.

Sin embargo, si se desea, el A-X y B-Y pueden ser expresados en la misma célula.

Los compañeros de unión X y Y tienen afinidad entre sí y actúan como el equivalente biológico del velcro® o una barra y un imán y mantienen el complejo unido entre sí. Ventajosamente, esto significa que las proteínas de fusión A-X e Y-B pueden ensamblarse con facilidad en un complejo proteico biespecífico simplemente mezclando entre sí las proteínas de fusión. Por tanto, el complejo proteico biespecífico de la presente divulgación tiene una estructura modular que permite ensamblar con facilidad dos proteínas diferentes con el fin de producir grandes paneles de permutaciones de complejos proteicos biespecíficos con diferentes combinaciones de especificidades de antígeno, por ejemplo, en forma tipo cuadrícula. Esto permite el cribado eficiente y sistemático de un gran número de complejos proteicos biespecíficos con el fin de detectar una función biológica aditiva, sinérgica o novedosa.

Dado que X e Y son específicos el uno para el otro, esto reduce significativamente la capacidad de formar homodímeros. X e Y se denominan en conjunto en el presente documento par de unión o compañeros de unión. En una realización, X no tiene alta afinidad por otras X. En una realización, Y no tiene alta afinidad por otras Y. Ventajosamente, cuando X e Y no forman homodímeros, esto evita la formación de complejos proteicos monoespecíficos no deseados, aumenta el rendimiento de los complejos proteicos biespecíficos deseados, y elimina la necesidad de realizar etapas de purificación onerosas para eliminar los complejos proteicos monoespecíficos.

Esto permite un rápido ensamblaje de complejos proteicos biespecíficos con un rendimiento y/o pureza que no puede obtenerse eficazmente por la mayoría de los métodos de la técnica anterior, en particular, los métodos de la técnica anterior requieren generalmente amplias etapas de purificación. El rendimiento del complejo biespecífico es normalmente del 75 % o superior en la presente invención.

Más ventajosamente, los complejos proteicos biespecíficos permiten el cribado de complejos en donde las proteínas constituyentes (incluyendo antígenos unidos por las proteínas constituyentes) no tienen una relación conocida o se encuentran en diferentes vías potencialmente no relacionadas, tales como, dos proteínas que funcionan en dos vías distintas y, por ejemplo, que el experto en la materia no esperaría normalmente que entraran en contacto entre sí, pueden probarse en un complejo proteico biespecífico para identificar la función aditiva, sinérgica y/o novedosa.

Es más, pueden investigarse en paralelo múltiples regiones de unión (tales como las regiones variables) para determinado un antígeno o epítipo a fin de identificar matices en la función biológica. Esto permite investigar y

optimizar combinaciones de secuencias de región variable dirigidas a un determinado par de antígenos.

El presente método permite a la ciencia demostrar los resultados y no se basa en ideas preconcebidas y prejuicios técnicos sobre la función biológica. Este enfoque es potencialmente muy poderoso.

5 Ventajosamente, los componentes X e Y permiten ensamblar rápida y fácilmente un múltiplex que comprende complejos proteicos biespecíficos formados por diferentes permutaciones de proteínas de fusión.

10 Las proteínas A y B se seleccionan de fragmentos Fab y Fab'. Cuando los fragmentos Fab o Fab' se mantienen juntos como un complejo a través de X e Y, se forma un complejo de anticuerpo biespecífico.

Descripción de los dibujos

- Figura 1** es un diagrama esquemático que muestra las principales vías de señalización celular implicadas en la activación de las células T.
- Figura 2** es un diagrama esquemático que muestra la estructura y el ensamblaje de un complejo proteico biespecífico de la presente divulgación.
- Figura 3** es una tabla que muestra una cuadrícula 4x4 ilustrativa para el cribado funcional utilizando el anticuerpo biespecífico de la presente invención. Utilizando esta cuadrícula, 16 complejos proteicos biespecíficos diferentes pueden ser ensamblados y cribados eficientemente en busca de una función sinérgica.
- Figura 4** es un diagrama esquemático que muestra un complejo de anticuerpos biespecíficos representativo de la presente divulgación. El diagrama representa cómo dos fragmentos Fab diferentes se unen para formar un complejo de anticuerpos biespecíficos a través de la interacción de alta afinidad entre los compañeros de unión unidos a los fragmentos Fab.
- Figura 5** es un gráfico que muestra los resultados de un experimento de citometría de flujo que demuestra que dos fragmentos Fab que son específicos para dos antígenos diana diferentes conservan sus especificidades y son capaces de coacoplar sus correspondientes antígenos diana simultáneamente cuando los dos fragmentos Fab se combinan para formar un complejo de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación. Los resultados demuestran además al invertir la unión de los compañeros de unión unidos a los fragmentos Fab no se ve afectada la capacidad de los fragmentos Fab para unirse específicamente a sus respectivos antígenos diana. El control de no formación de complejos no muestra ninguna unión detectada cuando ambas especificidades se fusionan con el péptido (Y:Y). Área rellena = [Fab anti-antígeno 5-péptido "GCN4"]: [Fab anti-antígeno 6-péptido "GCN4"]: [antígeno 6 biotinilado]: [FITC-STREP]. Sin control de formación de complejos. Línea delgada = [Fab anti-antígeno 5-scFv "52SR4"]: [Fab anti-antígeno 6-péptido "GCN4"]: [antígeno 6 biotinilado]: [FITC-STREP] Línea gruesa = [Fab anti-antígeno 5-péptido "GCN4"]: [Fab anti-antígeno 6-scFv "52SR4"]: [antígeno 6 biotinilado]: [FITC-STREP]
- Figura 6** es un gráfico y una tabla que muestran un trazado de BIAcore, que demuestra la alta afinidad de los compañeros de unión entre sí. Se detecta la unión de Fab A-scFv "52SR4" al péptido "GCN4" en el chip.
- Figura 7** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la Akt fosforilada para combinaciones de anticuerpos biespecíficos y bivalentes con especificidad para el antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y antígeno 2.
- Figura 8** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la PLCg2 fosforilada para combinaciones de anticuerpos biespecíficos y bivalentes con especificidad para el antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y antígeno 2.
- Figura 9** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la expresión de CD86 para combinaciones de anticuerpos biespecíficos y bivalentes con especificidad para el antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y antígeno 2.
- Figura 10** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la Akt fosforilada para mezclas biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad para el antígeno 1 y el antígeno 2 así como controles Fab' únicos.
- Figura 11** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la Akt fosforilada para mezclas biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad para el antígeno 3 y el antígeno 2.
- Figura 12** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la PLCg2 fosforilada para mezclas biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad para el antígeno 3 y el antígeno 2.
- Figura 13** es un gráfico que muestra la titulación del efecto de la combinación biespecífica de antígeno 3 y antígeno 2 en los niveles de IκB totales en células B estimuladas con anti-

IgM.

- Figura 14** es un gráfico que muestra la titulación del efecto de la combinación biespecífica de antígeno 3 y antígeno 2 en la expresión de CD86 en células B estimuladas con anti-IgM.
- Figura 15** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la Akt fosforilada para mezclas biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad para el antígeno 4 y el antígeno 2.
- Figura 16** es un gráfico de barras de la potencia relativa de la inhibición de la PLCg2 fosforilada para mezclas biespecíficas y bivalentes de anticuerpos con especificidad para el antígeno 4 y el antígeno 2.
- Figura 17** es un gráfico que muestra la titulación del efecto de la combinación biespecífica de antígeno 4 y antígeno 2 en la expresión de CD86 en células B estimuladas con anti-IgM.
- Figura 18** es un gráfico que muestra los trazos de la señal de exclusión por tamaños A280 superpuestos del experimento 1 del Ejemplo 11. Los trazos mostrados son: control Fab-X (VR4247), control Fab-Y (VR4248) y mezcla con relación molar 1 a 1 a 500 µg/ml del complejo Fab-X (VR4247) y Fab-Y (VR4248). Los picos se detectaron a una absorbancia de 280 nm.
- Figura 19** es un gráfico que muestra los trazos de la señal de exclusión por tamaños A214 superpuestos del experimento 2 del Ejemplo 11. Los trazos mostrados son: control Fab-X (VR4130), control Fab-Y (VR4131) y mezcla con relación molar 1 a 1 a 500 µg/ml del complejo Fab-X (VR4130) y Fab-Y (VR4131). Los picos se detectaron a una absorbancia de 214 nm.
- Figura 20** es un gráfico que muestra los trazos de la señal de exclusión por tamaños A214 superpuestos del experimento 2 del Ejemplo 11. Los trazos mostrados son todos las mezclas con relación molar 1 a 1 de Fab-X (VR4130)/Fab-Y (VR4131) a 500 µg/ml, 50 µg/ml y 5 µg/ml como se indica. Los picos se detectaron a una absorbancia de 214 nm.
- Figura 21** es una tabla que muestra los datos de las especificidades cruzadas de la cuadrícula de antígenos. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de Syk y representan la media de las múltiples combinaciones de la región V evaluadas.
- Figura 22** es una tabla que muestra los datos de las especificidades cruzadas de la cuadrícula de antígenos. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de PLCg2 y representan la media de las múltiples combinaciones de la región V evaluadas.
- Figura 23** es una tabla que muestra los datos de las especificidades cruzadas de la cuadrícula de antígenos. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de AKT y representan la media de las múltiples combinaciones de la región V evaluadas.
- Figura 24** es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de la fosforilación de Syk, PLCg2 y AKT para cada combinación de la región V para el antígeno 2 en Fab-X combinado con el antígeno 3 en Fab-Y.
- Figura 25** es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de la fosforilación de Syk, PLCg2 y AKT de la fosforilación de Syk, PLCg2 y AKT para cada combinación de la región V para el antígeno 3 en Fab-X combinado con el antígeno 2 en Fab-Y.
- Figura 26** es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de la fosforilación de Syk, PLCg2 y AKT para cada combinación de la región V para el antígeno 2 en Fab-X combinado con el antígeno 4 en Fab-Y.
- Figura 27** es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición de la fosforilación de Syk, PLCg2 y AKT para cada combinación de la región V para el antígeno 4 en Fab-X combinado con el antígeno 2 en Fab-Y.
- Figura 28** es un gráfico que muestra los datos del porcentaje de inhibición de la expresión de CD71 inducida por anti-IgM en las células B, por antígeno3Fab'-X y antígeno2-Fab'-Y cuando la combinación es Fab' purificado o de sobrenadante transitorio. **Círculos** - Antígeno2Fab'-Y purificado + Antígeno3Fab'-X Cl_{50} 0,3224 nM **Cuadrados** - Antígeno2-Y Sup + Antígeno3-X transitorio Cl_{50} 0,2640 nM **Triángulo** - Control de sobrenadante transfectado simulado
- Figura 29** es un gráfico que muestra los datos del porcentaje de inhibición de la fosforilación inducida por anti-IgM de p38 en células B, por antígeno 3Fab'-X y antígeno 2-Fab'-Y cuando la combinación es Fab' purificado o de sobrenadante transitorio. **Círculos** - Antígeno2Fab'-Y purificado + Antígeno3Fab'-X Cl_{50} 0,1413 nM **Cuadrados** - Antígeno 2-Y Sup + antígeno 3-X transitorio Cl_{50} 0,1861 nM **Triángulo** - Control de sobrenadante transfectado simulado

Clave para las Figuras 30 a 33	1. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6066); 2. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6078); 3. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6079); 4. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6080); 5. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6082); 6. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6067); 7. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6068); 8. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6070); 9. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6071); 10. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6073); 11. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6075); 12. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6076); 13. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6077); 14. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6069); 15. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6072); 16. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6074); 17. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (VR6081); 18. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (TSUP-24117); 19. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (TSUP-24432); 20. Supe 1 simulado; 21. Supe 2 simulado; 22. Antígeno2Fab-Y (VR4447) + Antígeno3Fab-X (4126) purificado
Figura 30	es un gráfico que muestra la inhibición de las lecturas de fosfo por Fab-Y específico para antígeno2 (VR4447) purificado combinado con transitorios Fab-X específicos para antígeno3 en células B estimuladas con IgM de UCB_Cone_172.
Figura 31	es un gráfico que muestra la inhibición de las lecturas de fosfo por Fab-Y específico para antígeno 2 (VR4447) purificado combinado con transitorios Fab-X específicos para antígeno 3 en células B estimuladas con IgM de UCB_Cone_173
Figura 32	Inhibición de las lecturas de fosfo por Fab-Y específico para antígeno 2 (VR4450) purificado combinado con transitorios Fab-X específicos para antígeno 3 en células B estimuladas con IgM de UCB_Cone_172
Figura 33	Inhibición de las lecturas de fosfo por Fab-Y específico para antígeno 2 (VR4450) purificado combinado con transitorios Fab-X específicos para antígeno 3 en células B estimuladas con IgM de UCB_Cone_173
Figura 34	muestra los datos del porcentaje de inhibición de la fosforilación inducida por anti-IgM de PLCy2 en células B, por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2
Figura 35	muestra los datos del porcentaje de inhibición de la fosforilación inducida por anti-IgM de P38 en células B, por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2
Figura 36	muestra los datos del porcentaje de inhibición de la Akt fosforilada inducida por anti-IgM en células B, por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2
Figura 37	muestra los datos del porcentaje de inhibición de la expresión de CD71 inducida por anti-IgM en células B, por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2
Figura 38	muestra los datos del porcentaje de inhibición de la expresión de CD40 inducida por anti-IgM en células B, por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2.
Figura 39	muestra los datos del porcentaje de inhibición de la expresión de CD86 inducida por anti-IgM en células B, por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2
Figura 40	muestra la inhibición de la expresión de CD27 en células B por VR4447/VR4126 Bybe y VR4447/VR4126/VR645 BYbe/Albúmina
Figura 41	muestra la inhibición de la expresión de CD71 en células B por VR4447/VR4126 Bybe y VR4447/VR4126/VR645 BYbe/Albúmina
Figura 42	muestra la inhibición de la expresión de CD86 en células B por VR4447/VR4126 Bybe y VR4447/VR4126/VR645 BYbe/Albúmina
Figura 43	muestra la inhibición de la expresión de CD27 en células B por VR4447/VR4130 Bybe y VR4447/VR4130/VR645 BYbe/Albúmina
Figura 44	muestra la inhibición de la expresión de CD71 en células B por VR4447/VR4130 Bybe y VR4447/VR4130/VR645 BYbe/Albúmina
Figura 45	muestra la inhibición de la expresión de CD86 en células B por VR4447/VR4130 Bybe y VR4447/VR4130/VR645 BYbe/Albúmina

Descripción detallada

5 "Complejo proteico biespecífico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende dos proteínas (A y B, denominadas en el presente documento componentes biespecíficos, también denominadas en el presente documento primer componente proteico y segundo componente proteico, respectivamente, del biespecífico) que se retienen entre sí por un enlace heterodimérico. En una realización, una o ambas proteínas tienen un dominio de unión, por ejemplo, una o ambas proteínas son anticuerpos o fragmentos de los mismos (en particular, un fragmento Fab o Fab', estos complejos también se denominan Fab-Kd-Fab).

10

"Proteínas de fusión", como se emplea en el presente documento, comprenden un componente proteico A o B

- fusionado con un compañero de unión X o Y (según corresponda). En una realización, la proteína de fusión es una proteína de traducción expresada por técnicas recombinantes a partir de una construcción genética, por ejemplo, expresada en un huésped de una construcción de ADN. En el contexto de la presente divulgación, una de las características clave de una proteína de fusión es que puede expresarse como una "única proteína/unidad" a partir de una célula (por supuesto, en el caso de las proteínas de fusión que comprenden un fragmento Fab/Fab' habrá dos cadenas, pero esto se considerará una única proteína a efectos de la presente memoria descriptiva con una cadena, normalmente la cadena pesada fusionada en su extremo C-terminal con X o Y, según corresponda, opcionalmente a través de un enlazador como se describe en el presente documento más adelante).
- 10 La función del enlace heterodimérico X:Y es retener las proteínas A y B en proximidad entre sí, de modo que se pueda llevar a cabo o identificar la función sinérgica de A y B, por ejemplo, empleando el método descrito en el presente documento.
- 15 "Enlace heterodimérico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un enlace que comprende dos compañeros de unión diferentes X e Y que forman una interacción: (tal como una unión) entre sí que tiene una afinidad general que es suficiente para retener a los dos compañeros de unión entre sí. En una realización, X y/o Y no son aptos para formar homodímeros.
- 20 Enlazado heterodiméricamente y enlace heterodimérico se usan de forma intercambiable en el presente documento.
- En una realización "no apto para formar homodímeros", como se emplea en el presente documento, se refiere a la formación de los heterodímeros de X-Y que son más preferibles, por ejemplo, más estables, tales como termodinámicamente estables, una vez formados que los homodímeros. En una realización, la interacción de unión entre X e Y es monovalente.
- 25 En una realización, la interacción X-Y es más favorable que la interacción X-X o Y-Y.
- Esto reduce la formación de homodímeros X-X o Y-Y cuando se mezclan las proteínas de fusión A-X y B-Y. Normalmente, más del 75 % de heterodímeros se forma tras la mezcla con una relación molar 1:1.
- 30 Si se desea, puede emplearse una etapa de purificación (en particular, una purificación de una sola etapa), tal como cromatografía en columna, por ejemplo, para purificar las unidades de proteína de fusión y/o los complejos proteicos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación.
- 35 En una realización, se proporciona una etapa de purificación después de la expresión de la o de cada proteína de fusión, aunque normalmente los niveles de agregados son bajos. De este modo, en una realización, antes de la mezcla *in vitro*, la(s) proteína(s) de fusión se proporciona(n) en forma sustancialmente pura. Forma sustancialmente pura, como se emplea en el presente documento, se refiere a que la proteína de fusión es 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % monomérica.
- 40 En una realización no se realiza ninguna purificación de la proteína o proteínas de fusión.
- En una realización, cada unidad de proteína de fusión se expresa en un experimento/análisis de expresión diferente.
- 45 En una realización, no se realiza ninguna purificación de la proteína o proteínas de fusión antes de su mezcla para generar un complejo proteico biespecífico. En una realización, no se realiza ninguna purificación de la proteína o proteínas de fusión antes y/o después de la mezcla.
- En una realización, no se requiere ninguna purificación después de la formación del complejo proteico biespecífico.
- 50 En una realización, después de la mezcla, y generalmente sin purificación adicional, al menos el 50 % de la composición es el complejo proteico biespecífico deseado, por ejemplo, al menos el 60, 65, 70, 75, 80 % de la composición es el complejo proteico biespecífico deseado.
- 55 En una realización, la relación de proteínas de fusión empleada en la etapa de mezcla *in vitro* del presente método es AX a B-Y de 0,8:1 a 3:1, tal como 1,5:1 o 2:1.
- En una realización, la relación de proteínas de fusión empleada en la etapa de mezclado *in vitro* del presente método es BY a A-X de 0,8:1 a 3:1, tal como 1,5-1 o 2-1, en particular, una relación molar.
- 60 En una realización, la relación de A-X a B-Y empleada en la etapa de mezclado *in vitro* es 1:1, en particular, una relación molar de 1:1.
- 65 La presente divulgación también se extiende a un método para preparar un complejo biespecífico de acuerdo con la presente divulgación que comprende mezclar una proteína de fusión A-X y B-Y, por ejemplo en una relación molar de 1:1.

En una realización, el mezclado se produce *in vitro*.

En una realización, el mezclado se produce en una célula, por ejemplo, una célula hospedadora.

5 En una realización, la mezcla se produce *in vivo*, es decir, las proteínas de fusión A-X y B-Y interactúan entre sí dentro del cuerpo de un sujeto para formar el enlace heterodimérico y, en consecuencia, el complejo proteico biespecífico.

10 En una realización, X e Y son completamente específicos entre sí y no se unen a ningún otro péptido/proteína en una célula o en el cuerpo del sujeto. Esto puede lograrse, por ejemplo, asegurando que X e Y no estén presentes de forma natural en la célula diana o en el cuerpo del sujeto diana. Esto se puede lograr, por ejemplo, seleccionando que X o Y sean de una especie o entidad diferente a la del sujeto (p. ej., una proteína de levadura) y asegurando que la otra variable sea específica para el mismo. Ventajosamente, esto evita la unión de las proteínas de fusión A-X y/o B-Y a una diana no deseada, generando así efectos no deseados inespecíficos.

15 En una realización, uno (o al menos uno) de los compañeros de unión es incapaz de formar un homodímero, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos del compañero de unión es mutada para eliminar o minimizar la formación de homodímeros.

20 En una realización, ambos de los compañeros de unión son incapaces de formar un homodímero.

Incapaz de formar homodímeros o agregados, como se emplea en el presente documento, se refiere a una baja o nula propensión a formar homodímeros o agregados. Baja, como se emplea en el presente documento, se refiere a un 5 % o menos, tal como 4, 3, 2, 1, 0,5 % o menos de agregados, por ejemplo, después de la mezcla, la expresión o la purificación.

25 Pequeñas cantidades de agregados en las proteínas de fusión o residuales en el complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente tienen generalmente un efecto mínimo en el método de cribado de la presente divulgación. Por lo tanto, en una realización no se emplea ninguna purificación de la(s) proteína(s) de fusión y/o del(los) complejo(s) proteico(s) biespecífico(s) en el método, en particular, después de la etapa de mezcla.

30 En una realización: es una interacción de unión basada en fuerzas de atracción, por ejemplo, fuerzas de van der Waals, tales como el enlace de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, en particular, basado en la especificidad del anticuerpo para un antígeno (tal como un péptido).

35 En una realización: es un enlace covalente formado a partir de una interacción química específica, tal como química click. En una realización: no es un enlace covalente. En una realización, no se emplea química de conjugación/acoplamiento para preparar los complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación.

40 "Formar el complejo", como se emplea en el presente documento, se refiere a una interacción, incluyendo una interacción de unión o una reacción química, que es suficientemente específica y fuerte cuando los componentes de la proteína de fusión A-X y B-Y se ponen en contacto en condiciones apropiadas para que el complejo se ensamble y las proteínas de fusión se mantengan juntas.

45 "Mantenerse juntas", como se emplea en el presente documento, se refiere a la retención de los componentes (las proteínas de fusión) en proximidad entre sí, de tal manera que, tras la unión X:Y, el complejo puede manejarse como si fuera una sola molécula, y en muchos casos se comporta y actúa como una sola molécula. En una realización, la retención hace que el complejo sea adecuado para su uso en el método que se divulga en el presente documento, es decir, adecuado para su uso en al menos un cribado funcional.

50 Especificidad, como se emplea en el presente documento, se refiere a cuando, por ejemplo, los compañeros en la interacción, p. ej., X:Y o A y antígeno o B y antígeno solo se reconocen entre sí o tienen una afinidad significativamente mayor entre sí en comparación con los no compañeros, por ejemplo, una afinidad al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor, que, por ejemplo, un nivel de fondo de unión a una proteína no compañero no relacionada.

55 La especificidad en relación con X e Y, como se emplea en el presente documento, se refiere a que los compañeros de unión X e Y en la interacción solo se reconocen entre sí o tienen una afinidad significativamente mayor entre sí en comparación con los no compañeros, por ejemplo, una afinidad al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor.

60 En una realización, la interacción de unión es reversible. En una realización, la interacción de unión es esencialmente irreversible.

65 Esencialmente irreversible, como se emplea en el presente documento, se refiere a una tasa de disociación (constante de disociación) baja del anticuerpo o del fragmento de unión.

En una realización, la interacción de unión entre X e Y tiene una constante de disociación baja.

Los ejemplos de una constante de disociación baja incluyen $1\text{-}9 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ o menos, por ejemplo, $1\text{-}9 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$, $1\text{-}9 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$, $1\text{-}9 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, $1\text{-}9 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ o $1\text{-}9 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$. Las constantes de disociación particularmente adecuadas incluyen $2 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ o menos, por ejemplo, $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ o $1 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$.

5 Aunque no se desea quedar limitado por la teoría, se cree que la constante de disociación baja (también denominada tasa de disociación) permite que las moléculas sean lo suficientemente estables para que el complejo proteico biespecífico sea útil, en particular en ensayos de cribado funcional.

10 En una realización, la afinidad de X e Y entre sí es de 5 nM o superior, por ejemplo, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM o superior.
En una realización, la afinidad de X e Y entre sí es de 900 nM o superior, tal como 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 pM o superior.

15 En otra realización, la afinidad de X e Y entre sí es de 10 nM o superior, por ejemplo, 9, 8, 7, 6 o 5 pM.

La afinidad es un valor calculado a partir de la tasa de asociación y disociación de la entidad. El término "afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su compañero de unión (p. ej., un péptido).

20 La afinidad de una molécula por su compañero de unión se puede representar en general por su constante de disociación (KD). La afinidad puede medirse mediante métodos habituales conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en el presente documento, tales como métodos de resonancia de plasmón superficial, en particular, BIAcore.

25 Sin embargo, la capacidad para mantener el complejo unido no es solo cuestión de afinidad. Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se formula la hipótesis que, de hecho, hay tres componentes significativos: la tasa de asociación, la tasa de disociación y la afinidad. El cálculo de la afinidad se basa en la tasa de asociación y la tasa de disociación. De este modo si la tasa de asociación es baja y la tasa de asociación es rápida, entonces la afinidad será baja y eso no será suficiente para mantener unido el complejo proteico biespecífico. Sin embargo, una tasa de asociación lenta podría ser compensada con una tasa de disociación lenta, dando una afinidad general adecuada. En algunas realizaciones, una tasa de asociación alta puede ser suficiente para mantener el complejo unido.

Si los compañeros de unión (X e Y) empleados en el complejo tienen una tasa de asociación lenta, entonces puede ser necesario un tiempo adicional después de mezclar los componentes para permitir que se forme el complejo.

35 Si la afinidad entre los compañeros de unión es lo suficientemente alta, puede ser posible que el complejo proteico biespecífico realice su función biológica deseada incluso si la afinidad de las proteínas (A y B) del complejo proteico biespecífico solo se una débilmente a sus dianas.

40 Por el contrario, si las proteínas (A y B) son capaces de unirse fuertemente a sus dianas, puede ser posible lograr la misma función biológica incluso si la afinidad de los compañeros de unión (X e Y) entre sí sea menor. En otras palabras, existe una relación de "trinidad" en la que una mayor afinidad entre los compañeros de unión puede compensar una menor afinidad por las dianas y viceversa.

45 En una realización, la afinidad de la proteína A por su ligando o antígeno es de aproximadamente 100 nM o más, tal como aproximadamente 50 nM, 20 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 250 pM, 200 pM, 100 pM o superior, en particular una afinidad de unión de 50 pM o superior.

50 En una realización, la afinidad de la proteína B por su ligando o antígeno es de aproximadamente 100 nM o más, tal como aproximadamente 50 nM, 20 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 250 pM, 200 pM, 100 pM o superior, en particular una afinidad de unión de 50 pM o superior.

55 En una realización, una interacción entre un dominio constante en una cadena pesada, tal como CH1 y un dominio constante en una cadena ligera, tal como CKappa, contribuye a la formación y/o estabilidad de un complejo biespecífico de acuerdo con la presente divulgación. De este modo, el empleo de fragmentos Fab o Fab' en los complejos biespecíficos de la presente divulgación es beneficioso.

60 En una realización, el complejo biespecífico de la presente divulgación no comprende un componente con una función efectora, por ejemplo, el complejo no comprende un dominio constante que no sea un CH1 y CKappa o CLambda, en particular no comprende dominios constantes seleccionados independientemente del grupo que comprende CH2, CH3, CH4 y combinaciones de los mismos. En una realización, el complejo biespecífico de la presente divulgación carece de una región Fc.

65 En una realización, el método del presente documento se emplea para cribar una biblioteca de fagos ya tratada mediante la preparación de proteínas de fusión de la divulgación a partir de la biblioteca.

Los complejos proteicos biespecíficos de la presente invención pueden usarse en cualquier aplicación adecuada, incluyendo cribado funcional. Este novedoso formato es particularmente útil en el cribado funcional múltiplex para identificar dianas proteicas basadas en la función, y epítomos óptimos en esas proteínas diana, que podrían ser direccionados por terapias biespecíficas.

Además, cuando las proteínas A y B son anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, los complejos proteicos biespecíficos también pueden utilizarse para el cribado funcional múltiplex con el fin de identificar pares de regiones variables óptimas para su uso en terapéuticos de anticuerpos biespecíficos.

"Múltiplex", como se emplea en el presente documento, es una población de entidades para prueba que comprende:

- al menos dos proteínas de fusión componentes (A-X e Y-B) combinadas para generar al menos un complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente y al menos un comparador biológico relevante en el mismo o diferente formato, o
- al menos dos complejos proteicos biespecíficos enlazado heterodiméricamente con, opcionalmente, al menos un comparador biológico relevante en el mismo o diferente formato.

Es evidente que para ser útil, el formato diferente empleado como comparador debe ser adecuado para pruebas en un ensayo funcional *in vitro* empleado en la divulgación. En un ejemplo, el comparador en el múltiplex es una mezcla monovalente de AX y B-X o un complejo monoespecífico bivalente de A-X-Y-A.

En una realización, el múltiplex comprende de 1 a cientos de miles de complejos proteicos biespecíficos enlazados heterodiméricamente, por ejemplo, de 2 a 500.000 de dichos complejos, tal como de 2 a 100.000 o de 2 a 10.000, en particular, generados a partir de una mezcla en una cuadrícula de 2 a 100s de primera y segunda proteínas de fusión (A-X y B-Y). En una realización, el múltiplex comprende, por ejemplo, de 2 a 1000, tal como de 2 a 900, de 2 a 800, de 2 a 700, de 2 a 600, de 2 a 500, de 2 a 400, de 2 a 300, de 2 a 200, de 2 a 100, de 2 a 90, de 3 a 80, de 4 a 70, de 5 a 60, de 6 a 50, de 7 a 40, de 8 a 30, de 9 a 25, de 10 a 20 o 15 complejos proteicos biespecíficos. Véase en la Figura 3 un ejemplo de dicha cuadrícula.

En una realización, el número de proteínas biespecíficas enlazadas heterodiméricamente en este múltiplex es n^2 , donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más.

El múltiplex puede estar en forma de una matriz, por ejemplo, una placa de microtitulación, en donde cada pocillo de la microplaca puede contener un complejo proteico biespecífico diferente. Los complejos proteicos biespecíficos pueden estar enlazados a una superficie de sustrato sólida, por ejemplo, unidos a una perla, o pueden estar suspendidos en forma líquida (p. ej., una solución o medio), por ejemplo, dentro de un pocillo o dentro de una gotita.

En una realización, cada "A" en el múltiplex es una proteína diferente, preferentemente un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que se une a un antígeno diana y cada "B" es una proteína diferente, preferentemente un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que se une a un antígeno diana.

En una realización, el múltiplex se proporciona en una cuadrícula como se discute a continuación, por ejemplo, 8x8, 16x16 o 16x20, que equivale a 64, 256 o 320 muestras respectivamente.

"Cuadrícula", como se emplea en el presente documento, se refiere a un gráfico o matriz bidimensional donde una variable, tal como una proteína A (en AX) se varía a lo largo de un eje, tal como el eje X (eje horizontal) y otra variable tal como la proteína B (en B-Y) se varía a lo largo del otro eje, tal como el eje Y (eje vertical). Esta disposición ayuda a evaluar sistemáticamente las diversas combinaciones (permutaciones) de las variables.

En una realización, el múltiplex se proporciona en placas de 96 pocillos y las muestras analizadas pueden ser múltiplos de los mismos, es decir, 96, 192, 384, etc.

Ventajosamente, una disposición en cuadrícula es particularmente ventajosa para cribar de forma eficiente la función biológica de los complejos proteicos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación.

La Figura 3 muestra un ejemplo de dicha cuadrícula, por medio de la cual 4 primeras proteínas de fusión pueden combinarse con facilidad con 4 segundas proteínas de fusión para producir 16 complejos proteicos biespecíficos.

Otras variaciones de una cuadrícula de cribado serán evidentes para el destinatario experto, por ejemplo, la primera proteína (A) en la primera proteína de fusión (A-X) puede mantenerse constante mientras que la segunda proteína (B) en la segunda proteína de fusión (B-X) se varía. Esto puede ser útil para cribar rápidamente un gran número de segundas proteínas diferentes en busca de una función sinérgica con la primera proteína preseleccionada.

En otra realización, la proteína A se varía a lo largo de un eje cambiando las regiones variables del anticuerpo de la proteína A, de manera que cada variante del anticuerpo es específica para el mismo antígeno pero tiene una combinación diferente de regiones variables. La proteína B puede mantenerse constante o también puede variarse de

la misma manera o variarse de forma que la especificidad del antígeno cambie (a través o hacia abajo de la cuadrícula) para las proteínas B.

5 Ventajosamente, dicha cuadrícula de cribado puede permitir potencialmente la detección de pequeñas diferencias en la función sinérgica cuando los complejos proteicos biespecíficos son específicos para los mismos antígenos pero con diferentes combinaciones de regiones variables.

10 En una realización, una primera proteína de fusión "común" (A-X) de acuerdo con la presente divulgación puede estar presente en cada pocillo. Un serie de segundas proteínas de fusión diferentes (BY) de acuerdo con la presente divulgación pueden entonces distribuirse en cada pocillo. Posteriormente, la interacción de unión específica de los dos compañeros de unión (X e Y) une físicamente las dos proteínas de fusión para formar los complejos proteicos biespecíficos. Esto da lugar a un múltiplex que comprende complejos proteicos biespecíficos que se unen a un primer antígeno diana común (unido por A) pero que también son capaces de unirse a un segundo antígeno diana (unido por B) que puede ser diferente para cada complejo proteico biespecífico.

15 En una realización, las proteínas de fusión B-Y comprenden diferentes regiones variables para el mismo antígeno diana para permitir la optimización de las regiones variables y/o epítomos del antígeno diana dado unido por B cuando se combina con las regiones variables en A-X.

20 La primera proteína de fusión "común", como se emplea en el presente documento, se refiere a proteínas de fusión en donde el componente A o B de las mismas, se une a las mismas proteínas o epítomo, en particular, cuando el componente A o B tiene identidad completa en la proteína de fusión común, es decir, la primera proteína de fusión común comprende siempre la misma secuencia de región variable.

25 El experto en la materia es consciente también de diferentes variaciones de lo anterior, de manera que las especificidades deseadas de los complejos proteicos biespecíficos en cada posición del múltiplex pueden controlarse con facilidad. Esto permite el cribado eficiente de diferentes combinaciones de complejos proteicos biespecíficos cuando dichos múltiplex se usan en ensayos funcionales. En una realización, se emplea un diseño factorial para definir las variables empleadas en la cuadrícula.

30 En una realización, el método de la presente divulgación es propicio para un análisis de alto rendimiento.

En una realización, múltiples complejos proteicos biespecíficos se analizan en paralelo o esencialmente de forma simultánea.

35 De forma simultánea, como se emplea en el presente documento, se refiere a cuando las muestras/moléculas/complejos se analizan en el mismo análisis, por ejemplo, en el mismo "análisis". Esto puede resultar ventajoso, ya que generalmente los reactivos empleados para un análisis de muestra determinada serán del mismo lote, concentración, fuente celular etc. y, por tanto, tienen las mismas propiedades. Por otra parte, en las condiciones ambientales en las que se realiza el análisis, tales como la temperatura y la humedad, son probablemente similares.

45 En una realización, de manera simultánea se refiere al análisis concomitante donde la salida de señal es analizada por un instrumento esencialmente al mismo tiempo. Esta señal puede requerir la deconvolución para interpretar los resultados obtenidos.

Ventajosamente, el análisis de múltiples complejos proteicos biespecíficos permite un cribado más eficiente de un gran número de complejos proteicos biespecíficos y la identificación de relaciones nuevas e interesantes.

50 En una realización, los múltiples complejos proteicos biespecíficos se analizan usando un múltiplex como se ha definido anteriormente y sometiendo los mismos a uno o más ensayos funcionales. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para detectar la función biológica sinérgica en un complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente de fórmula A-X:Y-B

55 en donde X:Y es un enlace heterodimérico
: es una interacción de unión entre X e Y,
A y B son componentes proteicos del biespecífico en forma de proteínas de fusión con X e Y respectivamente, comprendiendo dicho método las etapas de:

60 (i) ensayar la actividad en un ensayo funcional de una parte o la totalidad de un múltiplex que comprende al menos un complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente; y
(ii) analizar la(s) lectura(s) del ensayo funcional para identificar o detectar la función biológica sinérgica en el complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente; y

65 en donde Y es un antígeno y X es un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para Y o X es un antígeno e Y es un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para X.

La expresión "función biológica", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una actividad que es natural o el propósito de, la entidad biológica que se está analizando, por ejemplo, una actividad natural de una célula, proteína o similar. Idealmente, la presencia de la función biológica puede ser analizada mediante un ensayo funcional *in vitro*, incluyendo ensayos que empleen células de mamífero, tales como células vivas, tales como células B o T, o tejidos *ex vivo*. La función natural, como se emplea en el presente documento, también incluye una función aberrante, tal como las funciones asociadas a enfermedades, tales como cánceres.

Un "comparador biológico" relevante, como se emplea en el presente documento, se refiere a una entidad adecuada para evaluar la actividad, en el mismo ensayo que el empleado para el complejo proteico biespecífico, para establecer si hay algún cambio o actividad o función novedosa. Los comparadores adecuados para AX:Y-B pueden incluir una proteína purificada (incluyendo las proteínas recombinantes) en forma natural o presentada en el mismo formato que el biespecífico, p. ej., cuando A y B son la misma entidad, tal como A-X:Y-A o B-X:Y-B, es decir, un complejo monoespecífico bivalente. Alternativamente, la proteína de fusión A-X o B-Y en una forma no complejada puede emplearse como comparador solo o como una mezcla no complejada, tal como A-X y B-X en conjunto o A-Y y B-Y en conjunto.

Como alternativa, pueden emplearse múltiples comparadores de diferentes formatos (en particular, como se describe en el presente documento). El experto en la materia es capaz de identificar e incluir un control/comparador adecuado basándose en el conocimiento general común o en la información que se encuentra en la literatura.

La expresión "función sinérgica" o "función biológica sinérgica", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una actividad biológica o nivel de actividad biológica o un efecto sobre una función o actividad biológica que:

- no se observa con componentes individuales de la proteína de fusión hasta que se emplea un biespecífico (y puede incluir la actividad observada con una combinación de anticuerpos contra dichos antígenos, que no están en un formato biespecífico, pero en particular se refiere a la actividad únicamente observada cuando los dos dominios de unión están unidos en un formato biespecífico) o
- una actividad mayor o menor en comparación con la actividad observada cuando se emplean individualmente las primera y segunda proteínas de un complejo proteico biespecífico de la presente divulgación, por ejemplo, una actividad que solo se observa en una forma biespecífica.

Por lo tanto, "sinérgico/a" incluye una función biológica novedosa o una actividad novedosa. La función sinérgica, como se emplea en el presente documento, no incluye generalmente un simple direccionamiento, es decir, basándose únicamente en la unión, sino que generalmente implicará cierta inhibición, activación, señalización o similar después de la unión.

Función biológica novedosa o actividad novedosa, como se emplea en el presente documento, se refiere a una función o actividad biológica que no es aparente o está ausente hasta que las dos o más entidades sinérgicas (proteína A y proteína B) se ponen en contacto entre sí (como un biespecífico o de otro modo) o una función previamente no identificada.

Superior, como se emplea en el presente documento, se refiere a un aumento de la actividad, incluyendo un aumento desde cero, p. ej., cierta actividad en el biespecífico cuando el componente o componentes biespecíficos individuales no complejados no tienen actividad en el ensayo funcional relevante, también se denomina en el presente documento nueva actividad o función biológica novedosa. Superior, como se emplea en el presente documento, también incluye una función mayor que la aditiva en el biespecífico en un ensayo funcional relevante en comparación con los componentes biespecíficos individuales no complejados (analizados solos o en combinación con estar enlazados), por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 % o más de aumento en una actividad relevante.

En una realización, las proteínas no complejadas en conjunto tienen la misma actividad que el biespecífico y esta actividad o función era desconocida anteriormente. Esto es también una función sinérgica novedosa en el contexto de la presente memoria descriptiva.

En una realización, la función sinérgica es una función superior.

En una realización, la función sinérgica es una función inferior.

Función inferior, como se emplea en el presente documento, se refiere a que el biespecífico en el ensayo funcional relevante tiene menos o ninguna actividad en comparación con el(los) componente(s) biespecíficos no complejo(s) individual(es) que tiene(n) actividad en el ensayo funcional relevante, también denominado en el presente documento como nueva actividad o función biológica novedosa (tal como una proteína natural, es decir, una proteína aislada recombinante que no está en una proteína de fusión ni forma parte de ningún otro complejo que no sea el que se produce *in vivo* (incluyendo un dominio activo o un fragmento de dicha proteína) que se analiza como una proteína individual o que se analiza como una mezcla de proteínas en las mismas condiciones, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 % o más de reducción en una actividad relevante. Una reducción de la actividad superior

al 100 % se refiere a una ganancia de actividad positiva en una dirección diferente, por ejemplo, cuando una entidad es un agonista, una reducción de la actividad de más del 100 % puede convertir a la entidad en un antagonista y viceversa.

- 5 En una realización, la actividad del complejo biespecífico es inferior a la suma de la función conocida de la proteína A y la proteína B.

- 10 En algunas realizaciones, los complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación tienen una función biológica simplemente aditiva. Función biológica aditiva, como se emplea en el presente documento, se refiere a la función, que es la misma que la suma de cada uno de los componentes A y B individualmente, cuando se someten a las condiciones. Una función aditiva puede ser una función novedosa si la actividad o función era previamente desconocida o no identificada.

- 15 El cribado se realiza utilizando cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica, dependiendo de la función deseada que se va a identificar.

En una realización, el ensayo funcional empleado en un método de la presente divulgación es un ensayo *in vitro* o *ex vivo*.

- 20 Un "ensayo funcional", como se utiliza en el presente documento, es un ensayo que puede utilizarse para determinar una o más propiedades o actividades deseadas de los complejos proteicos biespecíficos, complejos de anticuerpos o la mezcla de anticuerpos sometidos a las condiciones del ensayo. Los ensayos funcionales adecuados pueden ser ensayos de unión, ensayos de apoptosis, ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés), ensayos de inhibición del crecimiento o de la proliferación celular (efecto citostático), ensayos de destrucción celular (efecto citotóxico), ensayos de señalización celular, ensayos de producción de citocinas, producción de anticuerpos y cambio de isotipo, factores de diferenciación celular, ensayos de formación de colonias, ensayos de quimiotaxis, ensayos de adhesión celular, ensayos de migración celular, ensayos del ciclo celular, ensayos metabólicos (función de la célula entera y de los orgánulos), ensayos para medir la inhibición de la unión del patógeno a una célula diana, ensayos para medir la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) u otras moléculas secretadas, ensayos para bacteriostasis, actividad bactericida, neutralización de virus, ensayos para medir la atracción de componentes del sistema inmunitario al sitio donde se unen los anticuerpos, incluyendo métodos de hibridación *in situ*, métodos de etiquetado y similares.

- 35 En una realización, los ensayos *in vivo*, tales como modelos animales, incluyendo modelos de tumores de ratón, modelos de enfermedad autoinmunitaria, modelos de roedores o primates infectados por virus o infectados por bacterias, y similares, pueden emplearse.

- 40 El experto en la materia es capaz de seleccionar un ensayo funcional adecuado basado en la diana/proteínas que se investigan. Sin embargo, los complejos pueden someterse a un panel de ensayos "convencional" sin preseleccionar ensayos que se consideren relevantes en un intento por identificar una nueva funcionalidad.

- 45 En el contexto de los complejos de anticuerpos biespecíficos, la eficacia de los complejos de anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente divulgación puede compararse con los anticuerpos individuales o las mezclas de anticuerpos (o fragmentos) en dichos modelos mediante métodos generalmente conocidos por un experto en la materia.

- 50 Por ejemplo, los complejos de anticuerpos biespecíficos pueden analizarse para comprobar la capacidad para inhibir la proliferación, afectar la viabilidad o la actividad metabólica de las células (por ejemplo, con una tinción tal como azul de alamar o mediante el control de la luminiscencia debido a la luciferasa expresada por las células), o provocar la apoptosis de las células cancerosas, que son funciones biológicas que incluyen propiedades distintas de la unión a un antígeno.

- 55 Al seleccionar ensayos funcionales estrechamente relacionados con una enfermedad particular de interés, los métodos de la divulgación permiten identificar anticuerpos potencialmente terapéuticos que se unen a moléculas diana conocidas o desconocidas. Por tanto, es posible identificar nuevas moléculas diana y/o identificar directamente anticuerpos potencialmente terapéuticos utilizando los métodos de la divulgación. Ventajosamente, el presente método no está limitado a ningún ensayo en particular y proporciona al usuario una completa flexibilidad para seleccionar el ensayo funcional más apropiado dependiendo de los requisitos.

- 60 Cuando se criban los complejos de anticuerpos biespecíficos para la función biológica deseada, pueden emplearse diversas estrategias. Por ejemplo, el medio que contiene los anticuerpos puede cribarse directamente para determinar la actividad biológica. Como alternativa, los anticuerpos pueden unirse a perlas recubiertas o a placas de microtitulación antes del cribado de la actividad biológica. Como alternativa, una proteína de fusión puede purificarse mediante una etiqueta His en una etapa de purificación de captura de níquel. Dichas estrategias pueden aumentar las concentraciones locales de los anticuerpos, lo que conduce a resultados más claros de los ensayos funcionales.

Los ensayos funcionales pueden repetirse varias veces, según sea necesario, con o sin diferentes muestras de un complejo de anticuerpo biespecífico particular, para mejorar la fiabilidad de los resultados. Pueden emplearse diversas pruebas estadísticas conocidas por el experto en la materia para identificar resultados estadísticamente significativos y así identificar complejos de anticuerpos biespecíficos con funciones biológicas.

Al establecer un ensayo funcional para el cribado, el experto en la materia puede establecer un umbral adecuado por encima del cual una actividad identificada se considera un "acierto". Cuando se utiliza más de un ensayo funcional, el umbral para cada ensayo puede fijarse a un nivel adecuado para establecer una tasa de aciertos manejable. En un ejemplo, la tasa de aciertos puede ser de 3-5 %. En un ejemplo, el criterio establecido al buscar pares de antígenos que inhiban la función de las células B puede ser de al menos un 30 % de inhibición de al menos dos fosfo-lecturas en un ensayo de activación de células B.

En los complejos proteicos biespecíficos de la presente invención pueden utilizarse los siguientes componentes proteicos y peptídicos.

En la presente invención, X se selecciona independientemente de un scFv, o un péptido, con la condición de que, cuando X es un péptido, Y es un scFv y, cuando X es un scFv, entonces Y es un péptido; en donde X o Y es un scFv específico para el péptido GCN4 representado por la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1; en donde el scFv se designa 52SR4 y está representado por la SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3 y en donde X o Y es un péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1).

Otros péptidos mencionados incluyen el grupo que comprende Fos/Jun (Fos de humano y murino tienen un número Uniprot P01100 y P01101 respectivamente y Jun de humano y murino tienen un número Uniprot 05412 y 05627 respectivamente), la etiqueta de HA que corresponde a los aminoácidos 98 a 106 de la hemaglutinina de la gripe humana, polihistidina (His), c-Myc y FLAG. Otros péptidos también se contemplan como adecuados para su uso en la presente divulgación y los péptidos particularmente adecuados son las etiquetas de afinidad para la purificación de proteínas puesto que tales péptidos tienen una tendencia a unirse con alta afinidad a sus respectivos compañeros de unión.

En una realización, el péptido no es E5B9.

El término "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero corto de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde el péptido contiene en el intervalo de 2 a 100 aminoácidos, por ejemplo, de 5 a 99, tal como 6 a 98, 7 a 97, 8 a 96 o 5 a 25. En una realización, un péptido empleado en la presente divulgación es una secuencia de aminoácidos de 50 residuos de aminoácidos o menos, por ejemplo, 40, 30, 20, 10 o menos. Los péptidos usados en la presente divulgación tienen una longitud suficiente para adaptarse a su propósito, por ejemplo, si el péptido es un enlazador, tiene que ser adecuadamente largo para permitir que el fragmento que enlaza realice su función biológica; alternativamente si el péptido es un compañero de unión, debe ser capaz de unirse específicamente a otra entidad, tal como un anticuerpo.

En una realización, el otro compañero de unión del par de unión (el primer o segundo compañero de unión alternativo) es una proteína.

"Proteína", como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos de 100 aminoácidos o más. En una realización, una "proteína", como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos con una estructura secundaria o terciaria.

Polipéptido y proteína se emplean indistintamente en el presente documento. Sin embargo, el polipéptido será generalmente una proteína con una estructura simple, por ejemplo, poca estructura secundaria y/o terciaria.

En una realización, la distinción entre un péptido y una proteína se basa en la presencia o ausencia de estructura secundaria y/o estructura terciaria, donde un péptido no tiene estructura secundaria y los aminoácidos con estructura secundaria y/o estructura terciaria se consideran una proteína.

En una realización, la proteína es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un antígeno diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, péptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno (también denominado en el presente documento sitio de unión), ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, "molécula de anticuerpo" incluye anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos. "Fragmentos de anticuerpo", como se emplea en el presente documento, se refieren a fragmentos de unión a anticuerpo, pero no se limitan a Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único, scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión

- a epítomos de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23(9): 1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216:165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para su uso en la presente divulgación
- 5 incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO05/003169, WO05/003170 y WO05/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, p. ej., biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, los documentos WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).
- 10 Un "fragmento de unión", como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento capaz de unirse a un péptido o a un antígeno diana con suficiente afinidad para caracterizar el fragmento como específico para el péptido o antígeno.
- 15 La expresión "fragmento Fab", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un fragmento de cadena ligera que comprende un dominio VL (variable ligero) y un dominio constante de una cadena ligera (CL) y un dominio VH (variable pesado) y un primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. En un ejemplo, las secuencias de la cadena pesada del fragmento Fab "terminan" en la cisteína intercadena de CH1. En una realización, el fragmento Fab empleado en una proteína de fusión de la presente divulgación, tal como A-X y/o B-Y es monovalente.
- 20 Un fragmento Fab', como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab que comprende además la totalidad o parte de una región bisagra. En una realización, el fragmento Fab' empleado en una proteína de fusión de la presente divulgación, tal como A-X y/o B-Y es monovalente.
- 25 La expresión "Fv de cadena única" o abreviado como "scFv", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende dominios de anticuerpo VH y VL unidos (por ejemplo, por un enlazador peptídico) para formar una única cadena polipeptídica. Las regiones constantes de la cadena pesada y ligera se omiten en este formato. Los Fv de cadena única, como se emplea en el presente documento, incluyen versiones estabilizadas con disulfuro de los mismos en donde, además del enlazador peptídico, un enlace disulfuro está presente entre las
- 30 regiones variables.
- El scFv estabilizado con disulfuro puede eliminar la propensión de algunas regiones variables a respirar dinámicamente, lo cual se refiere a que las regiones variables se separan y se juntan de nuevo.
- 35 La expresión "anticuerpo de un solo dominio", como se usan en el presente documento, es un fragmento de anticuerpo que consiste en un solo dominio variable monomérico de anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen VH o VL o VHH.
- 40 En una realización, el fragmento de unión a anticuerpo y/o el complejo de anticuerpo biespecífico no comprende una región Fc. "No comprende una región Fc", como se emplea en el presente documento, se refiere a los dominios constantes inferiores, tales como CH2, CH3 y CH4 que están ausentes. Sin embargo, dominios constantes tales como CH1, CKappa/CLambda pueden estar presentes.
- 45 En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, kappa o lambda.
- En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, kappa o lambda.
- 50 La primera proteína, A, y la segunda proteína, B, del complejo proteico biespecífico es un fragmento Fab o Fab'. Dicho complejo proteico biespecífico puede denominarse complejo de anticuerpo biespecífico.
- "Complejo de anticuerpo biespecífico", como se emplea en el presente documento, se refiere a un complejo proteico biespecífico que comprende al menos dos sitios de unión a anticuerpo, en donde los anticuerpos componentes,
- 55 fragmentos o ambos están complejados entre sí por un enlace heterodimérico.
- Un complejo de anticuerpo biespecífico suele referirse a una molécula que comprende al menos dos sitios de unión a antígeno, en donde los sitios de unión tienen una especificidad no idéntica.
- 60 En una realización, las dos proteínas (fragmentos Fab o Fab') se orientan selectivamente al mismo antígeno, por ejemplo, uniéndose a dos epítomos diferentes en el mismo antígeno diana, también denominado en el presente documento biespecífico biparatópico.
- 65 En otra realización, las dos proteínas (fragmentos Fab o Fab') pueden tener diferentes especificidades antigénicas, por ejemplo, uniéndose a dos antígenos diana diferentes.

En otra realización más, las dos proteínas son idénticas, es decir, se unen al mismo epítipo en el mismo antígeno diana y el complejo es por lo tanto monoespecífico.

5 En una realización, cada anticuerpo o fragmento empleado en el complejo de anticuerpo biespecífico de la divulgación comprende un sitio de unión, es decir, cada sitio de unión es monovalente para cada antígeno diana.

Los fragmentos Fab o Fab' empleados en las proteínas de fusión (A-X o B-Y) pueden ser monoespecíficos o monovalentes.

10 Ventajosamente, el uso de dos anticuerpos biespecíficos o fragmentos de anticuerpo permite que el complejo de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación sea potencialmente específico para hasta 4 antígenos diferentes (es decir, el complejo puede ser tetraespecífico). Esto permite investigar los efectos de tipo avidez.

15 El fragmento de anticuerpo empleado en la primera proteína de fusión (A-X) es un Fab o Fab'.

El fragmento empleado en la segunda proteína de fusión (B-Y) es un Fab, o Fab'.

20 "Monoespecífico", como se emplea en el presente documento, se refiere a la capacidad de unirse a un solo antígeno diana.

"Monovalente", como se emplea en el presente documento, se refiere a que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo tiene un solo sitio de unión y, por lo tanto, solo se une al antígeno diana una sola vez.

25 El fragmento Fab o Fab' empleado en la primera proteína de fusión (A-X) es monovalente y el fragmento Fab o Fab' empleado en la segunda proteína de fusión (B-Y) es multivalente.

En una realización, A-X o B-Y no es una proteína de fusión que comprende dos scFvs, uno específico para el antígeno CD33 y otro específico para el antígeno CD3 o, alternativamente, un formato de complejo biespecífico específico para estos dos antígenos.

30 En una realización, el A-X o B-Y no es una proteína de fusión que comprende un scFv (o alternativamente otro formato de anticuerpo) específico para CD3 enlazado a un péptido E5B9.

35 Un "dominio o sitio de unión", como se emplea en el presente documento, es la parte del anticuerpo que entra en contacto con el antígeno/epítipo y participa en una interacción de unión con el mismo. En una realización, el dominio de unión contiene al menos un dominio variable o un derivado del mismo, por ejemplo, un par de dominios variables o derivados de los mismos, tal como un par de dominios variables análogos o un derivado de los mismos.

40 En una realización, el dominio de unión comprende 3 CDRs, en particular cuando el dominio de unión es un anticuerpo de dominio tal como un VH, VL o VHH. En una realización, el dominio de unión comprende dos dominios variables y 6 CDRs y una región marco conservada, y en conjunto estos elementos contribuyen a la especificidad de la interacción de unión del anticuerpo o fragmento de unión con el antígeno/epítipo.

45 Un "par análogo", como se emplea en el presente documento, se refiere a un par de cadena ligera y pesada aislado de un huésped como un par preformado. Esta definición no incluye dominios variables aislados de una biblioteca, en donde los emparejamientos originales de un huésped no se conservan. Los pares análogos pueden ser ventajosos porque a menudo maduran por afinidad en el huésped y, por lo tanto, pueden tener una alta afinidad por el antígeno para el que son específicos.

50 Un "derivado de un dominio de origen natural", como se emplea en el presente documento, pretende hacer referencia a uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia de origen natural que han sido reemplazados o deletados, por ejemplo, para optimizar las propiedades del dominio, por ejemplo, eliminando propiedades indeseables, pero en donde se conserva(n) la(s) característica(s) singular(es) del dominio. Algunos ejemplos de modificaciones son aquellas para eliminar sitios de glicosilación, anclajes a GPI o lisinas expuestas a disolventes.

55 Estas modificaciones se pueden lograr reemplazando los residuos de aminoácidos relevantes con una sustitución de aminoácidos conservadora.

60 En una realización, los complejos de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación o los componentes de anticuerpo/fragmento de los mismos se procesan para proporcionar afinidad mejorada para un antígeno o antígenos diana. Dichas variantes se pueden obtener mediante varios protocolos de maduración por afinidad que incluyen la mutación de las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), barajado de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), barajado de ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), expresión en fago (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (Supra) analiza

65 estos métodos de maduración por afinidad.

En una realización, el primer fragmento Fab o Fab' (A) es específico para un primer antígeno y el segundo fragmento Fab o Fab' (B) es específico para un segundo antígeno, en donde los primer y segundo antígenos son diferentes. Ventajosamente, el complejo de anticuerpo biespecífico puede ser específico para dos antígenos diferentes. Esto presenta la posibilidad de que el complejo de anticuerpo se una a dos antígenos diferentes, cada uno ubicado en una entidad diferente, poniendo de esta manera a las dos entidades en cercana proximidad física una con otra.

Como alternativa, el primer fragmento Fab o Fab' (A) puede ser específico para un primer epítipo y el segundo fragmento Fab o Fab' (B) puede ser específico para un segundo epítipo, en donde los primer y segundo epítipos están ambos en el mismo antígeno. Esto puede aumentar en gran medida la avidéz del complejo de anticuerpo biespecífico por el antígeno debido a las múltiples interacciones entre el antígeno y el complejo de anticuerpo biespecífico.

En una realización, el primer anticuerpo (A) o el segundo anticuerpo (B), o tanto el primer como el segundo anticuerpo de un complejo de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación puede ser una IgG, opcionalmente con una región Fc inactiva o activa.

También se hace referencia, pero que no forma parte de la invención, a la situación donde, el primer (A) o el segundo (B) fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento de unión a antígeno (Fab), un Fab', un fragmento variable de cadena única (scFv) y un anticuerpo de dominio único (sdAb), tal como un VHH.

En una realización, el primer anticuerpo/fragmento (A), el segundo anticuerpo/fragmento (B) o tanto el primer como el segundo anticuerpo/fragmento del complejo de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación puede ser un Fab.

En una realización, el primer anticuerpo/fragmento (A), el segundo anticuerpo/fragmento (B) o tanto el primer como el segundo anticuerpo/fragmento del complejo de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación puede ser un Fab'.

Por comodidad, los complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación se denominan en el presente documento A-X:Y-B. Sin embargo, esta nomenclatura no pretende limitar el diseño de la proteína de fusión A-X y B-Y, ya que nuestros experimentos indican que los compañeros de unión X e Y pueden invertirse, es decir, A-Y y B-X sin afectar negativamente al método. Por lo tanto, A y B y X e Y son etiquetas nominales a las que se hace referencia para ayudar a la explicación de la presente tecnología.

"Fijado", como se emplea en el presente documento, se refiere a conectado o unido directa o indirectamente a través de un enlazador, tal como un enlazador peptídico, ejemplos del cual se discuten a continuación. Conectado directamente incluye la fusión entre sí (por ejemplo, un enlace peptídico) o conjugado químicamente.

"Compañero de unión", como se emplea en el presente documento, se refiere a un elemento componente de un par de unión.

En una realización, la afinidad de los compañeros de unión es alta, 5 nM o superior, tal como 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 pM o superior.

"Par de unión", como se emplea en el presente documento, se refiere a dos compañeros de unión que se unen específicamente entre sí. Algunos ejemplos de un par de unión incluyen un péptido y un anticuerpo o fragmento de unión específico del mismo, o una enzima y un ligando, o una enzima y un inhibidor de esa enzima.

El primer compañero de unión (X) es el scFv 52SR4 de la SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3 o es el péptido GCN4 de la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1.

Cuando X es el scFv 52SR4 entonces Y es el péptido GCN4.

El segundo compañero (Y) es el scFv 52SR4 de la SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3 o es el péptido GCN4 de la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1. Cuando Y es el scFv 52SR4 entonces X es el péptido GCN4.

En una realización, el primer compañero de unión (X) se fija al extremo C-terminal de una cadena pesada o ligera en el fragmento Fab o Fab' de, por ejemplo, el primer compañero de unión (X) se fija al extremo C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' (A).

En otra realización, el segundo compañero de unión (Y) se fija al extremo C-terminal de la cadena pesada o cadena ligera del segundo fragmento Fab o Fab' de B, por ejemplo, el segundo compañero de unión (Y) se fija al extremo C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' de (B).

En una realización, X se fija al extremo C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' (proteína A) e Y se fija al extremo C-terminal de la cadena pesada del fragmento Fab o Fab' (proteína B).

En una realización, X se fija mediante un enlazador (tal como ASGGGG SEQ ID NO: 71 o ASGGGGSG SEQ ID NO: 72) o cualquier otro enlazador adecuado conocido en la técnica o descrito en el presente documento a continuación, al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento (proteína A) e Y se fija mediante un enlazador (tal como ASGGGG SEQ ID NO: 71 o ASGGGGSG SEQ ID NO: 72) al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento (proteína B).

Algunos ejemplos de un par de unión adecuado (X o Y) pueden incluir GCN4 (SEQ ID NO: 1 o carecer de la etiqueta HIS, aminoácidos 1-38 de la SEQ ID NO: 1) o una variante del mismo y 52SR4 (SEQ ID NO: 3 o carecer de la etiqueta HIS, aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3) o una variante del mismo, que es un scFv específico para GCN4.

En una realización de la invención, el primer compañero de unión (nominalmente X) es GCN4 (como se muestra en la SEQ ID NO: 1) o una variante del mismo sin la etiqueta His y el segundo compañero de unión (nominalmente Y) es un scFv específico para GCN4 (como se muestra en la SEQ ID NO: 3 o una variante del mismo representada por los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO: 3).

En una realización de la invención, el primer compañero de unión (nominalmente X) es un scFv específico para GCN4 (como se muestra en la SEQ ID NO: 3) y el segundo compañero de unión (nominalmente Y) es GCN4 (como se muestra en la SEQ ID NO: 1).

Los presentes inventores han descubierto que el anticuerpo de cadena única 52SR4 y el péptido GCN4, son un par de unión adecuado para su uso en los complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación.

"Fragmento activo", como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento de aminoácido, que es menor que la secuencia completa de aminoácidos de la entidad y conserva esencialmente la misma actividad biológica o una actividad biológica relevante, por ejemplo, superior al 50 % de actividad, tal como el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 %.

"Identidad", como se utiliza en el presente documento, indica que en cualquier posición concreta de las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se utiliza en el presente documento, indica que, en cualquier posición concreta en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, leucina puede ser sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo pueden ser sustituidos entre sí incluyen, pero sin limitación:

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

Los grados de identidad y similitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, el software BLAST™ disponible en NCBI (Altschul, S.F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. y States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. *et al.*, 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656,).

En una realización, el primer o segundo compañero de unión (X o Y) es una proteína o un péptido.

En una realización, las primera y segunda proteínas de fusión comprenden uno o más enlazadores peptídicos. Los enlazadores pueden incorporarse en varios lugares en las proteínas de fusión. Por ejemplo, un enlazador puede introducirse entre un compañero de unión y la proteína fijada a este.

En una realización, el enlazador es un enlazador peptídico.

La expresión "enlazador peptídico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un péptido con una secuencia de aminoácidos. Un intervalo de enlazadores peptídicos adecuados será conocido por el experto en la materia.

En una realización, los compañeros de unión de los complejos proteicos biespecíficos se unen a sus respectivas proteínas mediante enlazadores peptídicos.

En una realización, las proteínas de fusión son una fusión de traducción, es decir, una proteína de fusión expresada en una célula hospedadora que comprende una construcción genética a partir de la cual se expresa la proteína de fusión.

En una realización, la proteína de fusión se prepara fusionando la cadena pesada de A con X y/o la cadena pesada de B con Y, opcionalmente a través de un enlazador peptídico.

- 5 En una realización, el enlazador peptídico tiene una longitud de 50 aminoácidos o menos, por ejemplo, 20 aminoácidos o menos.

Generalmente, será más eficiente expresar la proteína de fusión de forma recombinante y, por lo tanto, puede ser ventajoso un enlace peptídico directo o un enlazador peptídico que pueda ser expresado por una célula hospedadora.

- 10 En una realización, el enlazador se selecciona de una secuencia mostrada en la secuencia 5 a 72 o PPP.

Tabla 1. Secuencias enlazadoras bisagra

SEQ ID NO:	SECUENCIA
5	DKHTCAA
6	DKHTCPPCPA
7	DKHTCPPCPATCPPCPA
8	DKHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
9	DKHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
10	DKHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
11	DKHTCCVECPCPA
12	DKHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
13	DKHTCPSCPA

Tabla 2. Secuencias enlazadoras flexibles

SEQ ID NO:	SECUENCIA
14	SGGGGSE
15	DKHTS
16	(S)GGGGS
17	(S)GGGGSGGGGS
18	(S)GGGGSGGGSGGGGS
19	(S)GGGGSGGGSGGGSGGGGS
20	(S)GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
21	AAAGSG-GASAS
22	AAAGSG-XGGGS-GASAS
23	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
24	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
25	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
26	AAAGSG-XS-GASAS
27	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
28	ATTTGSSPGPT
29	ATTTGS
30	GS
31	EPSPGPISTINSPPSKESHKSP
32	GTVAAPSVFIFPPSD

(continuación)

SEQ ID NO:	SECUENCIA
33	GGGGIAPSMVGGGGS
34	GGGGKVEGAGGGGGS
35	GGGGSMKSHDGGGGS
36	GGGGNLITIVGGGGS
37	GGGGVVPSPGPGGGS
38	GGEKSIPGGGGS
39	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
40	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
41	TPSHLSHILPSFGLPTFN
42	RPVSPFTFPRLSNSWLP A
43	SPAAHFPRSIPRPGPIRT
44	APGPSAPSHRSLPSRAFG
45	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
46	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
47	SPQYPSPLTLTPPHPSL
48	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
49	LPWRTSLLPSLPLRRRP
50	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
51	VPPAPVVSLRSAHARPPY
52	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
53	PNVAHVLPLLTVPWDNLR
54	CNPLLPLCARSPAVRTFP
(S) es opcional en las secuencias 17 a 20.	

Algunos ejemplos de enlazadores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAAP (SEQ ID NO: 69), PPPP (SEQ ID NO: 70) y PPP.

5

Otros enlazadores se muestran en la **Tabla 3:**

SEQ ID NO:	SECUENCIA
55	DLCLRDWGCLW
56	DICLPRWGCLW
57	MEDICLPRWGCLWGD
58	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
59	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
60	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
61	EDICLPRWGCLWEDD
62	RLMEDICLPRWGCLWEDD
63	MEDICLPRWGCLWEDD
64	MEDICLPRWGCLWED

(continuación)

SEQ ID NO:	SECUENCIA
65	RLMEDICLARWGCLWEDD
66	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
67	RAPESFVCYWETICFERSEQ
68	EMCYFPGICWM

En un aspecto de la divulgación que no forma parte de la invención, se proporciona un método para producir un complejo proteico biespecífico de la presente divulgación, que comprende las etapas de:

- 5 (a) producir una primera proteína de fusión (A-X), que comprende una primera proteína (A), fijada a un primer compañero de unión (X) de un par de unión;
- (b) producir una segunda proteína de fusión (B-Y), que comprende una segunda proteína (B), fijada a un segundo compañero de unión (Y) de un par de unión; y
- 10 (c) mezclar las primera (A-X) y segunda proteínas de fusión (B-Y) preparadas en la etapa a) y b) en conjunto.

Normalmente, la mezcla de A-X y B-Y en la etapa (c) se encuentra en una relación molar de 1:1.

- 15 En una realización, cada una de las proteínas de fusión empleada en los complejos de la presente divulgación se produce mediante expresión en una célula hospedadora o células hospedadoras en un experimento de expresión.

En un aspecto, se proporciona un método para preparar un complejo proteico biespecífico de la presente divulgación, que comprende las etapas de:

- 20 (a) expresar una primera proteína de fusión (A-X), que comprende una primera proteína (A), fijada a un primer compañero de unión (X) de un par de unión;
- (b) expresar una segunda proteína de fusión (B-Y), que comprende una segunda proteína (B), fijada a un segundo compañero de unión (Y) de un par de unión;
- 25 en donde la proteína de fusión A-X y B-Y se expresan a partir de la misma célula hospedadora o células hospedadoras distintas. En dicho método, el complejo proteico biespecífico producido tiene la fórmula A-X:Y-B, en donde:

- A-X es una primera proteína de fusión;
- Y-B es una segunda proteína de fusión;
- 30 X:Y es un enlace heterodimérico;

en donde X se selecciona independientemente de scFv, o un péptido, con la condición de que, cuando X es un péptido, Y es un scFv y, cuando X es un scFv, entonces Y es un péptido;

- 35 en donde X o Y es un scFv específico para el péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1); en donde el scFv es 52SR4 (SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3) y en donde X o Y es un péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1).

Células hospedadoras distintas, como se emplea en el presente documento, se refiere a células individuales, incluyendo células del mismo tipo (incluso del mismo tipo clonal).

- 40 En una realización, la expresión es una expresión transitoria. El uso de expresión transitoria es muy ventajoso cuando se combina con la capacidad de generar complejos biespecíficos sin recurrir a la purificación. Esto da como resultado un método rápido para generar complejos proteicos biespecíficos, ya que la transfección transitoria es mucho más simple y requiere menos recursos que la transfección estable.

- 45 En una realización, la expresión es una expresión estable, es decir, en donde el ADN que codifica la proteína de fusión en cuestión se integra de forma estable en el genoma de la célula hospedadora.

- 50 En una realización, un polinucleótido que codifica A-X y un polinucleótido que codifica B-Y en la misma o en diferentes secuencias polinucleotídicas se transfectan en una célula como parte de un ensayo funcional, en donde las proteínas se expresan en la célula y/o se liberan de la misma. En particular, los polinucleótidos se transfectan de manera transitoria en el mismo o en diferentes plásmidos.

- 55 La mezcla de A-X y B-Y generalmente se efectúa en condiciones donde X e Y pueden interactuar. En una realización, las proteínas de fusión se incuban en medios de cultivo celular en condiciones de cultivo celular, por ejemplo, las proteínas de fusión se incuban durante 90 minutos en un entorno de 37 °C/CO₂ al 5 %.

En una realización, las proteínas de fusión de la presente divulgación se mezclan en un entorno acuoso, por ejemplo, una proteína de fusión puede unirse a una superficie sólida tal como una perla o una placa y la otra proteína de fusión puede introducirse en la misma en una solución/suspensión acuosa. La fase sólida permite que el exceso de componentes y reactivos sea enjuagado fácilmente. En una realización, ninguna fusión se fija a una fase sólida y simplemente se mezcla en un líquido/solución/medio. De esta manera, en una realización, A-X y B-Y se mezclan como proteínas libres en un medio acuoso.

Ventajosamente, el método de la presente divulgación se puede emplear para preparar complejos formados entre pares heterogéneos (es decir, entre la primera proteína de fusión [AX] y la segunda proteína de fusión [BY]) en donde las interacciones entre pares homogéneos (es decir, entre dos primeras proteínas de fusión [AX] o dos segundas proteínas de fusión [BY]) se minimizan. De esta manera, el presente método permite preparar un gran número de complejos proteicos biespecíficos, con contaminación mínima o nula con complejos homodiméricos. Una ventaja de las construcciones y el método de la presente divulgación es que la relación de A-X a B-Y está controlada por las propiedades de A-X y B-Y y, en particular, se puede lograr una relación molar de 1:1. Este elemento de control es una mejora significativa con respecto a ciertos métodos de la técnica anterior.

En una realización, un método de la presente divulgación comprende una etapa adicional de transferir un par de regiones variables (en particular dos pares de regiones variables) identificadas por tener actividad sinérgica en un formato biespecífico alternativo, opcionalmente, humanizando dichas regiones variables si es necesario de antemano, que es un formato terapéutico alternativo y/o un formato que tiene una semivida prolongada adecuado para ser analizado en ensayos con una duración más larga (por ejemplo, que duran una semana o más).

Los formatos multivalentes incluyen los conocidos en la técnica y los descritos en el presente documento, tales como DVD-Igs, FabFvs, por ejemplo, como se divulga en los documentos WO2009/040562 y WO2010/035012, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, etc.

Otros ejemplos de formatos biespecíficos y multiespecíficos (incluyendo los formatos terapéuticos) incluyen un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, scFv en tándem, scFv-Fc en tándem, FabFv, Fab'Fv, FabdsFv, Fab-scFv, Fab'-scFv, diFab, diFab', scdiacuerpo, scdiacuerpo-Fc, ScFv-Fc-scFv, scdiacuerpo-CH₃, IgG-scFv, scFv-IgG, V-IgG, IgG-V, DVD-Ig, y DuoCuerpo.

Diacuerpo, como se emplea en el presente documento, se refiere a dos pares Fv: VH/VL y otro par VH/VL que tienen dos enlazadores inter-Fv, de manera que el VH de un primer Fv está enlazado al VL del segundo Fv y el VL del primer Fv está enlazado al VH del segundo Fv.

Triacuerpo, como se emplea en el presente documento, se refiere a un formato similar al diacuerpo que comprende tres pares Fv y tres enlazadores inter-Fv.

Tetracuerpo, como se emplea en el presente documento, se refiere a un formato similar al diacuerpo que comprende cuatro pares Fv y cuatro enlazadores inter-Fv.

scFv en tándem, como se emplea en el presente documento, se refiere a dos scFvs (cada uno comprendiendo un enlazador de la forma habitual) enlazados entre sí mediante un único enlazador, de manera que hay un único enlazador inter-Fv.

scFv-Fc en tándem, como se emplea en el presente documento se refiere a dos scFvs en tándem, en donde cada uno está agregado al extremo N-terminal de un dominio CH₂, por ejemplo, mediante una bisagra, del fragmento de región constante -CH₂CH₃.

FabFv, como se emplea en el presente documento, se refiere a un fragmento Fab con una región variable agregada al extremo C-terminal de cada uno de los siguientes, el CH₁ de la cadena pesada y el CL de la cadena ligera. El formato puede proporcionarse como una versión PEGilada del mismo.

Fab'Fv, como se emplea en el presente documento, es similar al FabFv, en donde la porción Fab se sustituye con un Fab'. El formato puede proporcionarse como una versión PEGilada del mismo.

FabdsFv, como se emplea en el presente documento, se refiere a un FabFv en donde un enlace disulfuro intra-Fv estabiliza las regiones variables del extremo C-terminal agregadas. El formato puede proporcionarse como una versión PEGilada del mismo.

Fab-scFv, como se emplea en el presente documento, es una molécula Fab con un scFv agregado en el extremo C-terminal de la cadena ligera o pesada.

Fab'-scFv, como se emplea en el presente documento, es una molécula Fab' con un scFv agregado en el extremo C-terminal de la cadena ligera o pesada.

DiFab, como se emplea en el presente documento, se refiere a dos moléculas Fab enlazadas a través del extremo C-terminal de las cadenas pesadas.

DiFab', como se emplea en el presente documento, se refiere a dos moléculas Fab' enlazadas a través de uno o más enlaces disulfuro en la región de bisagra de las mismas.

Como se emplea en el presente documento, scdiacuerpo es un diacuerpo que comprenden un enlazador intra-Fv, de manera que la molécula comprende tres enlazadores y forma un scFv normal cuyos extremos terminales VH y VL están cada uno de ellos enlazado a una de las regiones variables de otro par Fv.

Scdiacuerpo-Fc, como se emplea en el presente documento, son dos scdiacuerpos, en donde cada uno está agregado al extremo N-terminal de un dominio CH2, por ejemplo, mediante una bisagra, del fragmento de región constante -CH2CH3.

ScFv-Fc-scFv, como se emplea en el presente documento, se refiere a cuatro scFvs, en donde cada uno se agrega al extremo N-terminal y al extremo C-terminal tanto de la cadena pesada como de la ligera de un fragmento -CH2CH3.

Scdiacuerpo-CH3, como se emplea en el presente documento, se refiere a dos moléculas de scdiacuerpo cada una enlazada, por ejemplo, mediante una bisagra a un dominio CH3.

IgG-scFv, como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un scFv en el extremo C-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras.

scFv-IgG, como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un scFv en el extremo N-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras.

V-IgG, como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un dominio variable en el extremo N-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras.

IgG-V, como se emplea en el presente documento, es un anticuerpo de longitud completa con un dominio variable en el extremo C-terminal de cada una de las cadenas pesadas o cada una de las cadenas ligeras

DVD-Ig (también conocido como IgG de doble dominio V) es un anticuerpo de longitud completa con 4 dominios variables adicionales, uno en el extremo N-terminal de cada cadena pesada o cada cadena ligera.

Duocuerpo o "intercambio de brazos Fab", como se emplea en el presente documento, es un formato de anticuerpo IgG biespecífico donde los cambios de aminoácidos modificados por ingeniería coincidentes y complementarios en los dominios constantes (normalmente CH3) de dos anticuerpos monoclonales diferentes conducen, tras mezclar, a la formación de heterodímeros. Un par de cadenas pesadas/ligeras del primer anticuerpo, como resultado de la ingeniería de residuos, preferirá asociarse con un par de cadenas pesadas:ligeras de un segundo anticuerpo.

Si están presentes los dominios de región constante de un complejo de anticuerpo biespecífico o de una molécula de anticuerpo de la presente divulgación, si está presente, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta del complejo o de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humana. En particular, los dominios de la región constante de IgG humana pueden usarse, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo se destina a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Como alternativa, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden utilizarse cuando la molécula de anticuerpo se destina a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Se apreciará que también pueden utilizarse variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, se pueden utilizar las moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado por prolina como se describe en Angal *et al.*, 1993, Molecular Immunology, 1993, 30:105-108. En consecuencia, en la realización donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, el anticuerpo puede incluir una mutación S241P.

Un experto en la materia entenderá también que los anticuerpos pueden sufrir una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones dependen a menudo de la línea celular hospedadora utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, la oxidación de metionina, la formación de diketopiperazina, la isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). En consecuencia, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo puede estar ausente.

La presente divulgación también proporciona una composición que comprende uno o más complejos proteicos biespecíficos como se ha descrito anteriormente, en donde la composición comprende predominantemente complejos biespecíficos heterodiméricos de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, con contaminación mínima o nula

con complejos homodiméricos.

En una realización, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de las proteínas de fusión en la composición están en forma de complejo proteico biespecífico.

En una realización, al menos un 60 % de las proteínas de fusión en la composición están en forma de complejo proteico biespecífico.

En una realización, los complejos formados no requieren más etapas de purificación y, por tanto, las composiciones comprenden complejos biespecíficos no purificados.

En una realización, los complejos formados requieren una etapa de purificación, por ejemplo, cromatografía en columna.

En una realización, el método comprende además al menos una etapa de purificación, por ejemplo después de la expresión de una proteína de fusión de acuerdo con la presente divulgación y antes de mezclar las proteínas de fusión.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión, un complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente, una composición que comprende una proteína de fusión o dicho complejo proteico biespecífico, un múltiplo, una matriz, una librería como se define en el presente documento.

En una realización, el complejo proteico biespecífico está en solución o en suspensión.

En una realización, los complejos proteicos biespecíficos pueden estar fijados en una superficie de sustrato sólida.

En una realización, el múltiplex está en forma de una matriz, por ejemplo, en una microplaca, tal como una placa de 96 o 384 pocillos. Dichas matrices pueden implementarse fácilmente en ensayos de cribado para identificar complejos proteicos biespecíficos con la funcionalidad deseada.

En otra realización, los complejos proteicos biespecíficos se conjugan con perlas.

Una proteína de fusión como se ha definido anteriormente es un componente del complejo proteico biespecífico de acuerdo con la presente divulgación. En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión descrita en el presente documento.

En un aspecto adicional, se proporciona una biblioteca, que comprende dos o más proteínas de fusión como se ha definido anteriormente.

El término "biblioteca", como se utiliza en el presente documento, se refiere a dos o más complejos de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación o a múltiples proteínas de fusión de la presente divulgación que pueden combinarse para formar al menos dos complejos de anticuerpos biespecíficos diferentes de acuerdo con la presente divulgación. Como se describe a lo largo de la presente memoria descriptiva, el término "biblioteca" se utiliza en su sentido más amplio y puede abarcar también subbibliotecas.

Ventajosamente, la biblioteca puede comprender un intervalo de proteínas de fusión diferentes que tienen el primer compañero de unión (X) o el segundo compañero de unión (Y) de un par de unión particular fijado a ellas. En una realización, parte de la biblioteca comprende proteínas/anticuerpos/fragmentos conectados cada uno a un compañero de unión X y el resto de la biblioteca comprende las mismas proteínas/anticuerpos/fragmentos conectados cada uno a un compañero de unión Y. Esto permite combinar fácilmente dos proteínas de fusión cualesquiera para formar un complejo proteico biespecífico de la presente divulgación, siempre que una proteína de fusión tenga fijado el primer compañero de unión de un par de unión y la otra proteína de fusión tenga fijado el segundo compañero de unión del par de unión.

En una realización, los complejos proteicos biespecíficos de la presente invención son adecuados para aplicaciones terapéuticas y pueden proporcionar terapias novedosas para tratar enfermedades. Por tanto, en un aspecto adicional, se proporciona un complejo proteico biespecífico como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia. El complejo proteico biespecífico es adecuado para tratar una serie de enfermedades, tales como enfermedad autoinmunitaria y cáncer.

Por el contrario, los complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación pueden modificarse por ingeniería genética con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para los linfocitos T, y otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para un antígeno específico del cáncer. Como resultado, los complejos de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación pueden poseer ventajosamente un mayor potencial citotóxico en comparación con los anticuerpos monoclonales ordinarios.

Los complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación también son particularmente adecuados para inhibir la función de las células B con el fin de controlar las reacciones inmunitarias y autoinmunitarias en diversas enfermedades autoinmunitarias.

- 5 Por tanto, la presente divulgación se extiende a un método para tratar una enfermedad en un paciente, que comprende la administración de un complejo proteico biespecífico de la presente divulgación.

En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación.

- 10 En una realización, se proporciona una proteína de fusión obtenida o que puede obtenerse por un método de la presente divulgación.

- 15 En una realización, se proporciona un complejo de anticuerpo biespecífico obtenido o que puede obtenerse a partir de un método de la presente divulgación

En una realización, se proporciona una molécula de anticuerpo biespecífico o multiespecífico que comprende combinaciones de regiones variables identificadas por un método de acuerdo con la presente divulgación.

- 20 En una realización, se proporciona una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión, un complejo de anticuerpo biespecífico o una molécula de anticuerpo biespecífico/multiespecífico obtenido a partir de un método de la presente divulgación.

- 25 Varios componentes diferentes pueden incluirse en la composición, incluyendo vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables. La composición puede, opcionalmente, comprender otras moléculas capaces de alterar las características de la población de anticuerpos de la invención, de esta manera, por ejemplo, reduciendo, estabilizando, retrasando, modulando y/o activando la función de los anticuerpos. La composición puede estar en forma sólida o líquida y puede, entre otras cosas, estar en forma de un polvo, un comprimido, una solución o un aerosol.

- 30 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un complejo proteico biespecífico de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En consecuencia, se proporciona el uso de un complejo proteico biespecífico de la invención para su uso en el tratamiento y para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección o trastorno patológico.

- 35 La afección o trastorno patológico, puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis tal como artritis reumatoide, asma tal como asma grave, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enteropatía inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, apoplejía, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, trastornos inflamatorios inmunomediados del sistema nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus eritematoso sistémico) y el síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, enfermedad de Graves, nefropatía por IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante, enfermedad cardíaca incluyendo enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, artrosis, periodontitis, hipocloridia y cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón y cáncer, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma de placenta, cáncer cervical y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de los mismos.

- 55 La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un complejo proteico biespecífico de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En consecuencia, se proporciona el uso de un complejo proteico biespecífico de la invención para su uso en el tratamiento y para la fabricación de un medicamento.

- 60 La composición se suministrará normalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

- 65 La presente divulgación también proporciona un proceso de preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo o el complejo proteico biespecífico de la presente invención entre sí con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un vehículo, solución o aditivo de formulación farmacéuticamente aceptable para mejorar las características deseadas de las composiciones de la presente divulgación. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (p. ej., tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, seroalbúmina), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración de la solución de disolvente tamponada utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de disolvente tamponada estéril, y la dispensación de la formulación en receptáculos estériles por métodos conocidos por los expertos en la materia.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser moléculas de metabolización lenta, grandes tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoácídicos y partículas víricas inactivas.

Pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para su ingestión por parte del paciente.

Los complejos proteicos biespecíficos de la invención pueden suministrarse dispersos en un disolvente, p. ej., en forma de una solución o suspensión. Pueden suspenderse en una solución fisiológica adecuada, p. ej., solución salina fisiológica, un disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para conseguir un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Como se ha mencionado anteriormente, se puede preparar una suspensión, por ejemplo, a partir de un anticuerpo liofilizado.

Una discusión detallada de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

El complejo de anticuerpos biespecíficos (o la molécula de anticuerpo biespecífico/multiespecífico de la presente divulgación) puede ser el único principio activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede ir acompañado de otros principios activos, incluyendo otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-célula T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes que no sean anticuerpos, tales como xantinas. Otros principios activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

En una realización adicional, el anticuerpo, fragmento o composición de acuerdo con la divulgación se emplea en combinación con otro agente farmacéuticamente activo, por ejemplo, un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y la proliferación celular (tales como rapamicina, ciclofosfida, metotrexato) o alternativamente un inhibidor de CD28 y/o CD40. En una realización, el inhibidor es una pequeña molécula. En otra realización, el inhibidor es un anticuerpo específico para la diana.

Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo de anticuerpo biespecífico de la invención (o una molécula de anticuerpo biespecífico/multiespecífico de la presente divulgación).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección a la que se dirige selectivamente o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, normalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede utilizarse para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración apropiados. Dicha información se puede usar a continuación para determinar las dosis útiles y las vías de administración en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la

enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante la experimentación rutinaria y queda a juicio del médico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg 50 mg/kg, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg.

5 Como alternativa, la dosis puede ser de 1 a 500 mg por día, tal como de 10 a 100, 200, 300 o 400 mg por día. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención.

10 Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (p. ej., simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se utiliza de forma profiláctica o para tratar una afección existente.

15 La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (p. ej., de 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (p. ej., de 2 a 15 días) puede ser necesario administrar una dosificación al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

20 En la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, pues si el pH de la formulación es 7, entonces puede ser apropiado un pl de 8-9 o superior. Si bien no se desea quedar ligado a la teoría, se cree que esto puede proporcionar en última instancia una formulación final con una estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

25 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por cualquier número de vías que incluyen, aunque no de forma limitativa, vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden usar hiposprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención.

30 El suministro directo de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o por vía intramuscular, o suministrarse en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en un tejido específico de interés. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

35 Cuando el producto sea para inyección o infusión, este puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el complejo proteico biespecífico (o molécula de anticuerpo biespecífico/multiespecífico de la presente divulgación) puede estar en forma seca, para su reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado. Si la composición se va a administrar por una vía que usa el tracto gastrointestinal, la composición deberá contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación pero que liberen el complejo proteico biespecífico una vez que se haya absorbido en el tracto gastrointestinal.

40 Puede proporcionarse una formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, como unidades de dosis única (p. ej., envases o viales de plástico sellados) empaquetados en sobres de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, p. ej., 2 ml de tampón disolvente/solución.

45 El término "variante", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido o proteína que contiene al menos una secuencia de aminoácidos o alteración de la secuencia de nucleótidos en comparación con la secuencia de aminoácidos o nucleótidos del péptido o proteína de tipo salvaje correspondiente. Una variante puede comprender al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el péptido o proteína de tipo salvaje correspondiente. Sin embargo, es posible que una variante comprenda menos del 80 % de identidad de secuencia, siempre que la variante muestre una función sustancialmente similar a su péptido o proteína de tipo salvaje correspondiente.

50 Los antígenos incluyen receptores de superficie celular, tales como receptores de señalización de células T o células B, moléculas coestimuladoras, inhibidores del punto de control, receptores de linfocitos citolíticos naturales, receptores de inmunoglobulinas, familia de receptores de TNFR, receptores de la familia B7, moléculas de adhesión, integrinas, receptores de citocinas/quimiocinas, GPCRs, receptores del factor de crecimiento, receptores de quinasas, antígenos específicos de tejidos, antígenos cancerosos, receptores de reconocimiento de patógenos, receptores del complemento, receptores hormonales, o moléculas solubles tales como citocinas, quimiocinas, leucotrienos, factores de crecimiento, hormonas o enzimas o canales iónicos, epítomos, fragmentos y formas postraduccionalmente modificadas de los mismos.

En una realización, el complejo proteico biespecífico comprende una o dos especificidades para receptor de superficie celular.

En una realización, el complejo proteico biespecífico comprende una o dos especificidades para receptor de citocinas o quimiocinas.

Los anticuerpos o fragmentos para un par de dianas identificadas por el método de acuerdo con la presente divulgación pueden incorporarse en cualquier formato adecuado para su uso como reactivo de laboratorio, un reactivo de ensayo o un terapéutico.

De este modo, en un aspecto, la divulgación se extiende al uso de fragmentos de anticuerpos o combinaciones de los mismos como pares en cualquier formato, ejemplos de los cuales se han dado anteriormente.

La divulgación también se extiende a las composiciones, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden dichos formatos novedosos con la especificidad para antígeno particular.

En un aspecto adicional, la divulgación incluye el uso de los formatos y las composiciones en el tratamiento.

En una realización, el complejo proteico biespecífico de la presente divulgación puede usarse para alterar funcionalmente la actividad del antígeno o antígenos de interés. Por ejemplo, el complejo proteico biespecífico puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno o antígenos, directa o indirectamente.

La presente divulgación también se extiende a un kit que no forma parte de la invención, comprendiendo, por ejemplo:

- a) una o más proteínas de fusión (A-X) que comprenden un primer Fab o Fab' (A) fijado a un primer compañero de unión de un par de unión (X); y
- b) una o más proteínas de fusión (B-Y) que comprenden un segundo Fab o Fab' (B) fijado a un primer compañero de unión de un par de unión (Y), en donde este último es específico para el primer compañero de unión;

en donde la interacción específica (tal como una interacción de unión) de los dos compañeros de unión forma un enlace heterodimérico que reúne físicamente las dos proteínas de fusión de a) y b) entre sí para formar un complejo proteico biespecífico; en donde la(s) proteína(s) de fusión está(n) en una forma complejada o no complejada;

1. en donde el complejo proteico biespecífico formó la fórmula A-X:Y-B, en donde:

A-X es una primera proteína de fusión;
Y-B es una segunda proteína de fusión;
X:Y es un enlace heterodimérico;
: es una interacción de unión entre X e Y;

A es un primer componente proteico del complejo proteico biespecífico seleccionado de un fragmento Fab o Fab';
B es un segundo componente proteico del complejo proteico biespecífico seleccionado de un fragmento Fab o Fab'; en donde X se selecciona independientemente de scFv, o un péptido, con la condición de que cuando X es un péptido Y es un scFv y cuando X es un scFv entonces Y es un péptido;

en donde X o Y es un scFv específico para el péptido GCN4 representado por la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1; en donde el scFv se designa 52SR4 y está representado por la SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3 y en donde X o Y es un péptido GCN4 (SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1).

Ventajosamente, el kit puede comprender complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación, o puede comprender proteínas de fusión que están en una forma complejada o no complejada. En el primer caso, los complejos proteicos biespecíficos están listos para su uso "fuera de la caja", lo que proporciona comodidad y facilidad de uso, mientras que en el segundo caso, los complejos proteicos biespecíficos pueden ensamblarse de acuerdo con las necesidades del usuario combinando diferentes proteínas de fusión.

En otra realización, un kit comprende además instrucciones de uso.

En otra realización más, el kit comprende además uno o más reactivos para realizar uno o más ensayos funcionales.

En una realización, proteínas de fusión, complejos proteicos biespecíficos, multiplexos, cuadrículas, bibliotecas, composiciones, etc., como se describe en el presente documento para su uso como reactivo de laboratorio.

En un aspecto adicional, se proporciona una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión y/o un complejo proteico biespecífico como se ha definido anteriormente.

En una realización, se proporciona una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica un complejo proteico biespecífico de acuerdo con la presente divulgación.

5 En una realización, se proporciona una secuencia de nucleótidos, por ejemplo una secuencia de ADN que codifica una molécula de anticuerpo biespecífico o multiespecífico de acuerdo con la presente divulgación.

La presente divulgación también se extiende a un vector que comprende una secuencia de nucleótidos como se ha definido anteriormente.

10 El término "vector", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un ejemplo de vector es un "plásmido", que es un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un
15 origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora, donde se replican posteriormente junto con el genoma del huésped. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector utilizada con más frecuencia.

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

25 La expresión "marcador seleccionable", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína cuya expresión permite identificar las células que han sido transformadas o transfectadas con un vector que contiene el gen marcador. Se conoce en la técnica un amplio intervalo de marcadores de selección. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable confiere generalmente resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en donde se ha introducido el vector. El marcador seleccionable también puede ser un marcador
30 visualmente identificable tal como, por ejemplo, un marcador fluorescente.

Algunos ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen rodamina, FITC, TRITC, Alexa Fluors y varios conjugados de los mismos.

35 También se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente divulgación. Puede usarse cualquier sistema de vector/célula hospedadora adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente divulgación. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos o eucarióticos, por ejemplo, también se pueden usar sistemas de expresión de células
40 hospederas de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o hibridoma.

La presente divulgación también proporciona un proceso para la producción de una proteína de fusión de acuerdo con la presente divulgación que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de la presente
45 divulgación en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de la proteína del ADN que codifica la molécula de la presente divulgación, y aislar la molécula.

Los complejos proteicos biespecíficos de la presente divulgación pueden usarse en kits de diagnóstico/detección, en donde se utilizan complejos proteicos biespecíficos con combinaciones particulares de especificidades para antígeno.
50 Por ejemplo, los kits pueden comprender complejos de anticuerpos biespecíficos que son específicos para dos antígenos, ambos de los cuales están presentes en el mismo tipo de célula, y en donde solo se puede realizar un diagnóstico positivo si ambos antígenos se detectan de forma satisfactoria. Al usar los complejos de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación en lugar de dos anticuerpos separados o fragmentos de anticuerpo en una forma no complejada, la especificidad de la detección se puede mejorar en gran medida.

55 En una realización, los complejos de anticuerpos biespecíficos se fijan sobre una superficie sólida. La superficie sólida puede ser, por ejemplo, un chip o una placa ELISA.

Se proporciona además el uso de un complejo proteico biespecífico de la presente divulgación para detectar en una
60 muestra la presencia de un primer y un segundo péptido, por lo que los complejos biespecíficos se utilizan como agentes de detección.

Los complejos de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación se pueden conjugar, por ejemplo, con un
65 marcador fluorescente que facilita la detección de complejos de anticuerpo-antígeno unidos. Dichos complejos de anticuerpos biespecíficos pueden utilizarse para microscopía de inmunofluorescencia. Como alternativa, los complejos de anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para transferencia western o ELISA.

En una realización, se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención).

- 5 En una realización, se proporciona un proceso para purificar una proteína de fusión o un complejo proteico biespecífico de acuerdo con la presente divulgación que comprende las etapas: realizar cromatografía de intercambio aniónico en modo sin unión de modo que las impurezas se retengan en la columna y el anticuerpo se mantenga en la fracción no unida. Las etapas pueden, por ejemplo, realizarse a un pH de aproximadamente 6-8.

- 10 El proceso puede comprender además una etapa de captura inicial que emplea cromatografía de intercambio catiónico, realizada, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4 a 5.

El proceso puede comprender además una etapa(s) de cromatografía adicional para asegurar que las impurezas relacionadas con el producto y el proceso se disipen adecuadamente de la corriente de producto.

- 15 El proceso de purificación también puede comprender una o más etapas de ultrafiltración, tal como una etapa de concentración y diafiltración.

- 20 "Forma purificada", como se ha utilizado anteriormente, pretende referirse a al menos un 90 % de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % p/p o más puro.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, "que comprende" debe interpretarse como "que incluye".

Referencias

- 25 1. Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries. Hanes J, Jermutus L, Weber-Bornhauser S, Bosshard HR, Plückthun A. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 14130-14135
- 30 2. Directed *in Vitro* Evolution and Crystallographic Analysis of a Peptide-binding Single Chain Antibody Fragment (scFv) with Low Picomolar Affinity. Zhand C, Spinelli S, Luginbuhl B, Amstutz P, Cambillau C, Plückthun A. (2004) J. Biol. Chem. 279, 18870-18877
3. Antigen recognition by conformational selection. Berger C, Weber-Bornhauser S, Eggenberger Y, Hanes J, Plückthun A, Bosshard H. R. (1999) F.E.B.S. Letters 450, 149-153

35 Ejemplos

Métodos generales empleados en algunos de los Ejemplos

- 40 Método general 1: PBMC humanas derivadas de conos de aféresis plaquetaria se agruparon como alícuotas congeladas. Antes de realizar un ensayo, las células fueron descongeladas, lavadas en DMEM (Life Technologies) y se dejaron aclimatar a 37 °C y en un entorno de CO₂ al 5 %.

- 45 Método general 2: Fab' A-X y Fab' B-Y se incubaron juntos durante 90 minutos (en un entorno de 37 °C/CO₂ al 5 %) antes de mezclar con 2,5x10⁵ PBMC en placas de 96 pocillos con fondo en V. Las PBMC más las combinaciones biespecíficas (Fab'A-X y Fab'B-Y) o bivalentes (p. ej., Fab'A-X Fab'A'-Y) se incubaron juntas durante otros 90 minutos. Después de este tiempo, las células B se activaron mediante la adición de 200 nM de IgM anti-humana F(ab')₂ de cabra (Southern Biotechnology) durante 8 minutos a 37 °C. A continuación, se detuvo la reacción de señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytofix (BD Biosciences). Las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de la centrifugación a 500 g durante 5 minutos. Se descartó el exceso de sobrenadante del sedimento celular, que se volvió a suspender en tampón de flujo y se lavó una vez más. A continuación, las células se volvieron a suspender en tampón Perm III enfriado en hielo (BD Biosciences) durante 30 minutos antes de ser lavadas dos veces en tampón de flujo.

- 50 Método general 3: Las células se activaron como se describe en el método general 2 y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD20 marcado con fluorescencia (BD Biosciences), un anticuerpo Akt anti-fosfo que reconoce un residuo de serina modificado en la posición 473, un anticuerpo PLCg2 anti-fosfo que reconoce un residuo de tirosina modificado en la posición 759 y un anticuerpo anti-IkB que reconoce IkB total. A continuación, se volvieron a suspender las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron otras dos veces y se volvieron a suspender en 25 µl de tampón de flujo. La expresión celular de CD20, Akt y PLCg2 se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™

Ejemplo 1 Construcción de un complejo de anticuerpo biespecífico de la presente divulgación FabB-GCN4(7P14P):52SR4-FabA

- 65 Las Figuras 2 y 4 muestran un complejo de anticuerpo biespecífico representativo de la presente divulgación. El complejo de anticuerpo biespecífico está compuesto por una primera y una segunda proteína de fusión.

La primera proteína de fusión (A-X) incluye un fragmento Fab (Fab A (también denominado Fab n.º 1) con especificidad para el antígeno 6, que está fijado a X un scFv (clon 52SR4 de SEQ ID NO: 3) a través de un enlazador peptídico ASGGGG SEQ ID NO: 71 que está enlazado al extremo c-terminal del dominio CH₁ del fragmento Fab y al dominio V_L del scFv. El propio scFv también contiene un enlazador peptídico situado entre sus dominios V_L y V_H.

La segunda proteína de fusión (B-Y) incluye un fragmento Fab (Fab B (también denominado Fab n.º 2) con especificidad para el antígeno 5). Sin embargo, en comparación con la primera proteína, el fragmento Fab está fijado a Y un péptido GCN4 (clon 7P14P de SEQ ID NO: 1) a través de un enlazador peptídico ASGGGG SEQ ID NO: 71 que está enlazado al dominio CH₁ del fragmento Fab.

El scFv, X, es específico y complementario al compañero de unión Y, GCN4. Como resultado, cuando las dos proteínas de fusión se ponen en contacto entre sí, se produce una interacción de unión no covalente entre el scFv y el péptido GCN4, conservando de esta manera físicamente las dos proteínas de fusión en forma de un complejo de anticuerpo biespecífico.

El anticuerpo de cadena única (scFv) 52SR4 se derivó construyendo y cribando una biblioteca VL-enlazador-VH-scFv de expresión de ribosomas de los bazo de ratones inmunizados con GCN4(7P14P) (Referencia 1). En otra publicación de 2004, se describe la maduración por afinidad de 52SR4 hasta un valor de 5 pM, utilizando de nuevo la expresión de ribosomas de bibliotecas aleatorizadas (Referencia 2).

El péptido GCN4 se derivó del factor de transcripción de levadura GCN4 mediante la inclusión de residuos de prolina en las posiciones 7 y 14, por tanto, GCN4(7P14P) permanece en un estado monomérico en la unión del scFv como se describe en una publicación de 1999 de Berger *et al* (Referencia 3).

Las secuencias de nucleótidos que codifican el péptido GCN4 y el scFv 52SR4 se clonaron en dos vectores separados corriente abajo de los vectores de expresión Fab de cadena pesada propios que contienen CH₁ y que ya están diseñados para recibir las regiones VH del anticuerpo.

Las regiones VH de un anticuerpo anti-antígeno 6 y de un anticuerpo anti-antígeno 5 se clonaron luego por separado en estos dos vectores de cadena pesada.

Las secuencias de nucleótidos que codifican el péptido GCN4 y el scFv 52SR4 se clonaron por separado en un primer y un segundo vector, respectivamente, corriente abajo de los vectores de expresión de cadena ligera propios que contienen CK y que están diseñados para recibir las regiones VL del anticuerpo.

Las regiones VL de un anticuerpo anti-antígeno 6 y de un anticuerpo anti-antígeno 5 se clonaron por separado en el marco con CK en un vector de expresión de cadena ligera propio para su coexpresión con el vector de cadena pesada apropiado para expresar las proteínas Fab-scFv y Fab-péptido. A continuación, los vectores se secuenciaron para confirmar que la clonación ha sido satisfactoria y que las células expresaron posteriormente por separado proteínas Fab-scFv y Fab-péptido con las regiones V del anticuerpo anti-antígeno 6 y del anticuerpo anti-antígeno 5, respectivamente. Los antígenos 5 y 6 en el Ejemplo 1 no son los antígenos marcados antígeno 5 y antígeno 6 en Ejemplos posteriores con los formatos de cuadrícula grande.

Ejemplo 2 - Demostración por citometría de flujo de la interacción scFv:péptido que forma un anticuerpo biespecífico no covalente que puede coacoplar dos antígenos diana simultáneamente

La Figura 5 muestra los resultados de un experimento de citometría de flujo que demuestra las especificidades para antígeno de dos complejos de anticuerpos biespecíficos diferentes formados usando la interacción de unión scFv:péptido.

El primer complejo de anticuerpo biespecífico se construyó utilizando las siguientes dos proteínas de fusión:

1. Fab anti-antígeno 5-scFv (52SR4); y
2. Fab anti-antígeno 6-péptido (GCN4)

El segundo complejo de anticuerpo biespecífico se construyó utilizando las siguientes dos proteínas de fusión:

1. Fab anti-antígeno 5-péptido (GCN4); y
2. Fab anti-antígeno 6-scFv (52SR4)

Por lo tanto, los dos complejos de anticuerpos biespecíficos tenían los mismos fragmentos Fab y los mismos compañeros de unión (es decir, 52SR4 y GCN4). La diferencia entre los dos complejos de anticuerpos biespecíficos radicaba en cuál fragmento Fab se fija a qué compañero de unión.

La mezcla de control que no formó un complejo se preparó a partir de las siguientes proteínas de fusión:

1. Fab anti-antígeno 5: GCN4; y
2. Fab anti-antígeno 6: GCN4

5 Para demostrar la capacidad de los complejos de anticuerpos biespecíficos para unirse al antígeno 5, los complejos se incubaron con células Jurkat que expresan el antígeno 5. Para demostrar la capacidad de los complejos de anticuerpos biespecíficos para unirse al antígeno 6, los complejos, una vez unidos al antígeno 5 en las células Jurkat, se pusieron posteriormente en contacto con el antígeno 6 biotinilado. A continuación, se detectó el antígeno 6 biotinilado utilizando estreptavidina marcada con fluorescencia.

10 Las células Jurkat luego se analizaron a través de una máquina de citómetro de flujo Facscalibur, en donde las células Jurkat marcadas con fluorescencia que solo habían podido marcarse cuando se unen a un complejo de anticuerpo biespecífico, que a su vez está unido al antígeno 6, indicando de esta manera que el complejo de anticuerpo biespecífico es capaz de unirse tanto al antígeno 5 como al antígeno 6 pueden separarse de las células Jurkat incubadas con dos proteínas de fusión capaces de unirse al antígeno 5 y al antígeno 6, ambos fusionadas con un péptido que no puede formar un complejo.

15 El gráfico FACS en la Figura 5 muestra cambios significativos tanto para los complejos de anticuerpos biespecíficos (línea fina y gruesa sobre y por encima del fondo relleno), demostrando así que los complejos de anticuerpos biespecíficos pueden unirse de forma satisfactoria a ambos antígenos diana y que la capacidad de unirse a ambos antígenos diana se conserva independientemente de si un fragmento Fab dado está conectado a un scFv o a un péptido.

25 La captura posterior de péptido o scFv fusionado C-terminalmente respectivamente al Fab anti-antígeno 6 permite una captura adicional del antígeno 6 biotinilado que se detecta en una capa final con estreptavidina marcada con fluorescencia. En consecuencia, los resultados representados en el gráfico FACS muestran que los complejos de anticuerpos biespecíficos de la presente divulgación pueden unirse satisfactoriamente a dos antígenos diana diferentes simultáneamente.

30 Los antígenos 5 y 6 en el Ejemplo 2 no son los antígenos marcados antígeno 5 y antígeno 6 en Ejemplos posteriores con los formatos de cuadrícula grande siguiente.

Ejemplo 3 - Demostración de Biacore de la interacción scFv:péptido

35 La Figura 6 muestra una trazo de resonancia de plasmón superficial que demuestra la afinidad de la interacción scFv:péptido (es decir, 52SR4:GCN4). La resonancia de plasmón superficial se realizó por medio de un Biacore 3000 (GE Healthcare). Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. La estreptavidina (producida internamente) se inmovilizó en un chip sensor CM5 (GE Healthcare) mediante la química de acoplamiento de amina hasta un nivel final de aproximadamente 1750 unidades de respuesta. Se utilizó tampón HBS-N (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M; GE Healthcare) como tampón de corrida para la inmovilización y la captura de péptidos. Se utilizó una inyección de 5 µl de Biotina-péptido GCN4 en HBS-N (10 nM, P. M. 4360) para lograr aproximadamente 6 UR de captura en la estreptavidina inmovilizada. El tampón de corrida se cambió a tampón HBS-EP + (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % (v/v); GE Healthcare) para medir la cinética de unión de scFv anti-GCN4 (52SR4). Diluciones en serie de tres veces de Fab-scFv (generado internamente) a partir de 30 nM, o control de tampón HBS-EP+, se inyectaron sobre el péptido GCN4 inmovilizado (asociación de 3 min, disociación de 15 min) a un caudal de 30 µl/min. La superficie se regeneró después de cada inyección a un caudal de 10 µl/min mediante dos inyecciones en serie de 60 segundos de guanidina-HCl 2M. Las curvas de unión restadas de fondo con doble referencia se analizaron usando el software 3000 BIAEval (versión 4.1) siguiendo procedimientos convencionales. Los parámetros de cinética se determinaron a partir del ajuste del algoritmo del modelo de unión 1:1. Los datos demuestran que el scFv tiene una afinidad por el péptido de 516 pM.

Ejemplo 4 - Producción de Fab-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab-B (Fab-péptido [B-Y]) para ensayos funcionales

55 Estrategia de clonación: El ADN de la región variable del anticuerpo se generó mediante PCR o síntesis génica flanqueando la secuencia de ADN de los sitios de enzimas de restricción. Estos sitios fueron *HindIII* y *XhoI* para las cadenas pesadas variables e *HindIII* y *BsiWI* para las cadenas ligeras variables. Esto hace que la región variable pesada se pueda ligar en los dos vectores de cadenas pesadas (pNAFH con FabB-Y y pNAFH con FabA-X) ya que tienen sitios de restricción complementarios. De este modo se liga la región variable corriente arriba (o 5') a las regiones constantes murinas y al péptido Y (GCN4) o al scFv X (52SR4) creando un marco de lectura completo. Las cadenas ligeras se clonaron en vectores kappa constantes murinos convencionales internamente (pMmCK o pMmCK S171C) que, de nuevo, utilizan los mismos sitios de restricción complementarios. El vector pMmCK S171C se utiliza si la región variable se aísla de un conejo. Los eventos de clonación se confirmaron mediante la secuenciación utilizando cebadores que flanquean todo el marco de lectura abierto.

65 Cultivo de CHOSXE: Las células CHOSXE en suspensión se preadaptaron al medio CDCHO (Invitrogen) suplementado con glutamax 2 mM (100x). Las células se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico agitadas a

140 rpm en una incubadora con agitador (Kuner AG, Birsfelden, Suiza) y se cultivaron a 37 °C suplementadas con CO₂ al 8 %.

Transfección por electroporación: Antes de la transfección, se determinó el número de células y su viabilidad mediante un contador celular CEDEX (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania) y se transfirió la cantidad necesaria de células (2x10⁸ células/ml) a tubos cónicos de centrifuga y se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos. Las células sedimentadas se volvieron a suspender en una solución de sales balanceadas de Earl estériles y se centrifugaron a 1400 rpm durante otros 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se volvieron a suspender los sedimentos hasta alcanzar la densidad celular deseada.

Se mezcló el ADN del vector a una concentración final de 400 µg para 2x10⁸ células/ml y se pipetearon 800 µl en cubetas (Biorad) y se electroporaron utilizando el sistema de electroporación propio. **Fab-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab-B (Fab-péptido [B-Y]) se transfectaron por separado.**

Las células transfectadas se transfirieron directamente a frascos Erlenmeyer de 1x3 l que contenían medio ProCHO 5 enriquecido con glutamax 2 mM y solución antimetabólica antibiótica (100X) (1 en 500) y las células se cultivaron en una incubadora con agitación Kuhner a 37 °C, CO₂ al 5 % y 140 rpm de agitación. Se añadió un suplemento alimenticio de 2 g/l de ASF (AJINOMOTO) a las 24 horas después de la transfección y la temperatura cayó a 32 °C durante otros 13 días de cultivo. En el cuarto día, se añadió butirato de sodio 3 mM (sal sódica de ácido n-butírico, Sigma B-5887) al cultivo.

En el día 14, los cultivos se transfirieron a tubos y el sobrenadante se separó de las células tras centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm. Los sobrenadantes retenidos se filtraron de nuevo a través de SARTOBRAN® P Millipore de 0,22 µm seguido de filtros de oro Gamma de 0,22 µm. Los niveles finales de expresión se determinaron mediante Protein G-HPLC.

Purificación a gran escala (1,0 l): Los Fab-A y Fab-B se purificaron por captura de afinidad utilizando los sistemas AKTA Xpress y las columnas de níquel preempaquetadas HisTrap Excel (GE Healthcare). Los sobrenadantes del cultivo se filtraron de forma estéril con un tamaño de 0,22 µm y se ajustó el pH a neutro, si es necesario, con ácido o base débil antes de cargarlos en las columnas. Una etapa de lavado secundario, que contenía imidazol 15-25 mM, se utilizó para desplazar de la resina de níquel cualquier proteína unida débilmente de la célula hospedadora/aglutinantes His no específicos. La elución se realizó con fosfato sódico 10 mM, pH 7,4 + NaCl 1 M + imidazol 250 mM y se recogieron fracciones de 2 ml. Un volumen de columna en la elución del sistema se pausó durante 10 minutos para fijar el pico de elución, y consecuentemente reducir el volumen de elución total. Se agruparon las fracciones más limpias eluidas y se intercambiaron el tampón en PBS (Sigma), pH 7,4 y se filtraron con un tamaño de 0,22 µm. Los grupos finales se evaluaron mediante barrido A280, SE-HPLC (método G3000), SDS-PAGE (reducido y no reducido) y para la endotoxina utilizando el sistema PTS Endosafe.

Ejemplo 5 - Uso de Fab-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab-B (Fab-péptido [B-Y]) en formato de complejo de complejo proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente para seleccionar combinaciones diana de antígenos funcionales, bivalentes y biespecíficos en función de la inhibición de la señalización de Akt (como una medida de la activación de células B)

Se prepararon PBMC humanas de acuerdo con el método general 1. Durante este periodo se crearon cuadrículas de anticuerpos biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares (200 nM) de Fab'-A (Fab-scFv) y Fab'-B (Fab-péptido) con una especificidad para antígeno variable para las proteínas de la superficie celular, antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y antígeno 2 en DMEM que contenía suero de ternera al 10 % y glutamina 2 mM. Esta cuadrícula se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Cuadrícula posible de combinaciones de anticuerpos biespecíficos y bivalentes con especificidad para antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y 2.

(A-X)	(B-Y) Fab B			
Fab A	Antígeno 3-Y	Antígeno 1-Y	Antígeno 4-Y	Antígeno 2-Y
Antígeno 3-X	3-X:Y-3	3-X:Y-1	3-X:Y-4	3-X:Y-2
Antígeno 1-X	1-X:Y-3	1-X:Y-1	1-X:Y-4	1-X:Y-2
Antígeno 4-X	4-X:Y-3	4-X:Y-1	4-X:Y-4	4-X:Y-2
Antígeno 2-X	2-X:Y-3	2-X:Y-1	2-X:Y-4	2-X:Y-2

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)
 Los Fab'-A-X y Fab'-B-Y se incubaron con PMBCs de acuerdo con el método general 2 tras la purificación como se ha descrito en el Ejemplo 4.

A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD20 marcado con fluorescencia (BD Biosciences) y un anticuerpo Akt anti-fosfo marcado con fluorescencia que reconoce un residuo de serina modificado en la posición 473 en la proteína. A continuación, se volvieron a suspender las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron otras dos veces y se volvieron a suspender

en 25 µl de tampón de flujo. La expresión celular de CD20 y Akt se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de Akt para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). El efecto relativo de las combinaciones de anticuerpos contra el antígeno 3 (VR0982), anticuerpos contra el antígeno 1 (VR4247), anticuerpos contra el antígeno 4 (VR4248) y anticuerpos contra el antígeno 2 (VR4246) se muestra en la tabla 5 (↓ = inhibición, ↑ = estimulación y ↔ = sin efecto general). El número de flechas es indicativo de la intensidad de la actividad.

Tabla 5: Tabla de la potencia relativa de la inhibición de la Akt fosforilada para combinaciones de anticuerpos biespecíficos y bivalentes con especificidad para el antígeno 3, 1, 4 y 2

(A-X) Fab A específico para	(B-Y) Fab B			
	Antígeno 3-Y	Antígeno 1-Y	Antígeno 4-Y	Antígeno 2-Y
Antígeno 3-X	↑↑	No ensayado	↑↑	↓↓↓
Antígeno 1-X	↔	↔	↔	↓↓↓↓
Antígeno 4-X	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Antígeno 2-X	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↔

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)

Estos datos también se muestran en forma de histograma (Figura 7): como valores medios y las barras de error muestran los intervalos de confianza del 95 %. Los datos muestran que las combinaciones de Fab contra antígeno 3 (VR0982) con Fab contra antígeno 2 (VR4246), Fab contra antígeno 1 (VR4247) con Fab contra antígeno 2 (VR4246) y Fab contra antígeno 4 (VR4248) con Fab contra antígeno 2 (VR4246) pueden inhibir la expresión de fosfo-Akt en las células B estimuladas con anti-IgM. En cambio, las combinaciones de Fab contra antígeno 3 (VR0982) con Fab contra antígeno 3 (VR0982) y Fab contra antígeno 3 (VR0982) con Fab contra antígeno 4 (VR4248) mostraron niveles elevados de expresión de fosfo-Akt. Todas las demás combinaciones analizadas no mostraron efecto alguno.

Ejemplo 6 - Uso del formato de complejo de proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente para seleccionar combinaciones diana de antígenos funcionales, bivalentes y biespecíficos en función de la inhibición de la señalización de PLCg2 (como una medida de la activación de células B).

Se prepararon PBMC humanas de acuerdo con el método general 1. Durante este periodo se crearon cuadrículas de anticuerpos biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares (200 nM) de Fab'-A (Fab-scFv [A-X]) y Fab'-B (Fab-péptido [B-Y]) con una especificidad para antígeno para las proteínas de la superficie celular, antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y antígeno 2 en DMEM que contenía suero de ternera al 10 % y glutamina 2 mM. Esta cuadrícula se muestra en la Tabla 6.

Los Fab'-A-X y Fab'-B-Y se incubaron de acuerdo con el método general 2.

A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD20 marcado con fluorescencia (BD Biosciences) y un anticuerpo PLCg2 anti-fosfo marcado con fluorescencia que reconoce un residuo de tirosina modificado en la posición 759 en la proteína. A continuación, se volvieron a suspender las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en 25 µl de tampón de flujo. La expresión celular de CD20 y PLCg2 se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de PLCg2 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). El efecto relativo de las combinaciones de "anticuerpos" contra antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y antígeno 2 se muestra en la tabla 6 (↓ = inhibición, ↑ = estimulación y ↔ = sin efecto general). El número de flechas es indicativo de la intensidad de la actividad.

Tabla 6: Tabla de la potencia relativa de la inhibición de la PLCg2 fosforilada para combinaciones de anticuerpos biespecíficos y bivalentes con especificidad para antígeno 3, 1, 4 y 2.

(A-X) Fab A específico para	(B-Y) Fab B			
	Antígeno 3-Y	Antígeno 1-Y	Antígeno 4-Y	Antígeno 2-Y
Antígeno 3-X	↑	No ensayado	↑↑	↓↓↓

(continuación)

(A-X) Fab A específico para	(B-Y) Fab B			
	Antígeno 3-Y	Antígeno 1-Y	Antígeno 4-Y	Antígeno 2-Y
1-X	↔	↔	↔	↓↓
4-X	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
2-X	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	↔

donde X es un scFv e Y es un péptido

Estos datos también se representan en forma de histograma (Figura 8), mostrando los valores medios y las barras de error son intervalos de confianza del 95 %. Los datos muestran que las combinaciones de un Fab contra antígeno 3 (VR0982) con un Fab contra antígeno 2 (VR4246), un Fab contra antígeno 1 (VR4247) con un Fab contra antígeno 2 (VR4246), un Fab contra antígeno 4 (VR4248) con un Fab contra antígeno 2 (VR4246) pueden inhibir la expresión de fosfo-PLC γ 2 en las células B estimuladas con anti-IgM. En cambio, las combinaciones de un Fab contra antígeno 3 (VR0982) con un Fab contra antígeno 3 (VR0982) y un Fab contra antígeno 3 (VR0982) con un Fab contra antígeno 4 (VR4248) mostraron niveles elevados de expresión de fosfo-PLC γ 2. La combinación de un Fab contra antígeno 1 con un Fab contra antígeno 1 no mostró ningún efecto.

Ejemplo 7 - El uso del formato de complejo de proteico biespecífico enlazado heterodiméricamente para seleccionar combinaciones diana de antígenos funcionales, bivalentes y biespecíficos en función de la expresión de CD86 (como una medida de la activación de células B).

Se prepararon PBMC humanas de acuerdo con el método general 1. Durante este periodo se crearon cuadrículas de anticuerpos biespecíficos o bivalentes diluyendo cantidades equimolares (200 nM) de Fab'-X (Fab-scFv) y Fab'-Y (Fab-péptido) con una especificidad para antígeno para las proteínas de la superficie celular, antígeno 3, antígeno 1, antígeno 4 y antígeno 2 en DMEM que contenía suero de ternera al 10 % y glutamina 2 mM. Esta cuadrícula se muestra en la Tabla 7.

Fab' A-X y Fab' B-Y se incubaron juntos durante 90 minutos (en un entorno de 37 °C y CO₂ al 5 %) antes de mezclar con 2,5 x 10⁵ PBMC en placas de 96 pocillos con fondo en V. Las PBMC más las combinaciones biespecíficas o bivalentes se incubaron en conjunto durante otros 90 minutos. Transcurrido este tiempo, las células B se activaron mediante la adición de 200 nM de IgM anti-humano F(ab')₂ de cabra (Southern Biotechnology) durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las placas se colocaron en hielo y se lavaron una vez en tampón de flujo helado (PBS + ASB 1 % + 0,01 % de NaN₃). A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD19 marcado con fluorescencia (BD Biosciences) y un anticuerpo anti-CD86 marcado con fluorescencia y se incubaron en hielo durante 1 hora en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron otras dos veces y se volvieron a suspender en 25 μ l de tampón de flujo. La expresión celular de CD19 y CD86 se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de CD86 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). El efecto relativo de las combinaciones de Fab contra antígeno 3 (VR0982), Fab contra antígeno 1 (VR4247), Fab contra antígeno 4 (VR4248) y Fab contra antígeno 2 (VR4246) se muestra en la tabla 7 (↓ = inhibición, ↑ = estimulación y ↔ = sin efecto general). El número de flechas es indicativo de la intensidad de la actividad.

Tabla 7: Tabla de la potencia relativa de la inhibición de la expresión CD86 en células B para combinaciones de anticuerpos biespecíficos y bivalentes con especificidad para antígeno 3, 1, 4 y 2

(A-X) Fab A específico para	(B-Y) Fab B			
	Antígeno 3-Y	Antígeno 1-Y	Antígeno 4-Y	Antígeno 2-Y
Antígeno 3-X	↑	No ensayado	↔	↓↓↓
Antígeno 1-X	↔	↔	↑↑	↔
Antígeno 4-X	No ensayado	No ensayado	No ensayado	No ensayado
Antígeno 2-X	↓↓↓	↓	↓↓↓	↓↓

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)

Estos datos también se muestran como un histograma (Figura 9), como valores medios y las barras de error son intervalos de confianza del 95 %. Los datos muestran que las combinaciones de un Fab contra antígeno 3 (VR0982)

con un Fab contra antígeno 2 (VR4246), un Fab contra antígeno 1 (VR4247) con un Fab contra antígeno 2 (VR4246), un Fab contra antígeno 4 (VR4248) con un Fab contra antígeno 2 (VR4246) y un Fab contra antígeno 2 (VR4246) con un Fab contra antígeno 2 (VR4246) pueden inhibir la expresión de CD86 en las células B estimuladas con anti-IgM. Por el contrario, las combinaciones de un Fab contra antígeno 3 (VR0982) con un Fab contra antígeno 3 (VR0982) y un Fab contra antígeno 1 (VR4247) con un Fab contra antígeno 4 (VR4248) mostraron niveles elevados de expresión de CD86. Todas las demás combinaciones analizadas no mostraron efecto alguno.

Ejemplo 8 - El efecto inhibidor de un Fab contra antígeno 1 (VR4247) y un Fab contra antígeno 2 (VR4246) solo puede reproducirse cuando los anticuerpos se disponen en una orientación biespecífica.

Se prepararon PBMC humanas de acuerdo con el método general 1. Durante este periodo se crearon combinaciones de anticuerpos biespecíficos o bivalentes o mezclas diluyendo cantidades equimolares (200 nM) de Fab'A-X (Fab-scFv) y/o Fab'B-Y (Fab-péptido) con una especificidad para antígeno para las proteínas de la superficie celular, antígeno 1 y antígeno 2 en DMEM que contenía suero de ternera al 10 % y glutamina 2 mM. Además, también se añadieron controles de fab individuales (Fab'-X y Fab'-Y). Estas combinaciones se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Cuadrícula de mezclas biespecíficas, bivalentes o Fab individuales con especificidad para antígeno 1 y antígeno 2

(A-X) Fab A específico para	(B-Y) Fab B			
	-	Antígeno 1-Y	Antígeno 2-Y	Antígeno 2-X
Antígeno 1-X	1-X	1-X:Y-1	1-X:Y-2	1-X X-2
Antígeno 2-X	2-X	2-X:Y-1	2-X:Y-2	-
Antígeno 1-Y	1-Y	-	1-Y Y-2	-
Antígeno 2-Y	2-Y	-	-	-

donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)
Los Fab'A-X y/o Fab'B-Y se incubaron de acuerdo con el método general 2.

A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD20 marcado con fluorescencia (BD Biosciences) y un anticuerpo Akt anti-fosfo marcado con fluorescencia que reconoce un residuo de serina modificado en la posición 473 en la proteína. A continuación, se volvieron a suspender las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron otras dos veces y se volvieron a suspender en 25 µl de tampón de flujo. La expresión celular de CD20 y Akt se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™.

Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de Akt para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). La Figura 10 muestra que solo la combinación biespecífica de un Fab contra antígeno 1 (VR4247) y un Fab contra antígeno 2 (VR4246), pero no cualquier otra combinación, puede modular los niveles de fosfo-Akt en células B (los datos representan valores medios y las barras de error son intervalos de confianza del 95 %).

Ejemplo 9 - El efecto inhibidor de un anti-antígeno 3 (VR0982) y un anti-antígeno 2 (VR4246) solo puede reproducirse cuando los anticuerpos se disponen en una orientación biespecífica

Se prepararon PBMC humanas de acuerdo con el método general 1. Durante este periodo se crearon combinaciones de anticuerpos biespecíficos o bivalentes o mezclas diluyendo cantidades equimolares (200 nM) de Fab'X (Fab-scFv) y/o Fab'Y (Fab-péptido) con una especificidad para antígeno para las proteínas de la superficie celular, antígeno 1 y antígeno 2 en DMEM que contenía suero de ternera al 10 % y glutamina 2 mM. Estas combinaciones se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Cuadrícula de biespecíficos, bivalentes o mezclas con especificidad para antígeno 3 y 2

(A-X) Fab A específico para	(B-Y) Fab B		
	Antígeno 3-Y	Antígeno 2-Y	Antígeno 2-X
Antígeno 3-X	3-X:Y-3	3-X:Y-2	3-X X-2
Antígeno 2-X	2-X:Y-3	2-X:Y-2	-
Antígeno 3-Y	-	3-Y Y-2	-

(continuación)

(A-X) Fab A específico para	(B-Y) Fab B		
	Antígeno 3-Y	Antígeno 2-Y	Antígeno 2-X
donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4) Los Fab'A-X y/o Fab'B-Y se incubaron de acuerdo con el método general 2. A continuación, las células se tiñeron de acuerdo con el método general 3.			

Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de Akt y PLCg2 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células). Las Figuras 11 y 12 muestran que solo la combinación biespecífica con el antígeno 3 y el antígeno 2, pero no con las mezclas de anticuerpos anti-antígeno 3 (VR0982) y anti-antígeno 2 (VR4246), inhibieron la expresión de Akt fosforilada y de PLCg2 (los datos representan valores medios y las barras de error son intervalos de confianza del 95 %).

Para validar la inhibición observada con la combinación biespecífica con antígeno 3 y con antígeno 2, esta combinación se tituló junto con una mezcla de anticuerpos anti-antígeno 3 (VR0982) y anti-antígeno 2 (VR4246) y se midió la inhibición de IκB intracelular total (lectura de señalización) y de CD86 (marcador de activación después de 24 horas) en las células B.

Como puede verse en la Figura 13, una combinación de antígeno-3-X/antígeno-2-Y, pero no la combinación de antígeno-3-X/antígeno-2-X (es decir, como mezcla simple no vinculada), fue capaz de inhibir la activación de la señal NF-κB tras la estimulación con anti-IgM, medida por el nivel de proteína IκB total. La CI_{50} , extrapolada mediante un ajuste de curva logística de 4 parámetros utilizando Graphpad Prism 6, fue de 7,5 nM (los datos representan valores medios y las barras de error son desviaciones típicas). Adicionalmente, una titulación de la combinación de antígeno-3-X/antígeno-2-Y, pero no la combinación de antígeno-3-X/antígeno-2-X, fue capaz de inhibir la expresión de CD86 inducida por anti-IgM en las células B después de 24 horas (véase la Figura 14). La CI_{50} , extrapolada mediante un ajuste de curva logística de 4 parámetros utilizando Graphpad Prism 6, fue de 10,3 nM (los datos representan valores medios y las barras de error son desviaciones típicas).

Ejemplo 10 El efecto inhibitor de un anti-antígeno 4 y un anti-antígeno 2 solo puede reproducirse cuando los anticuerpos se disponen en una orientación biespecífica.

Se prepararon PBMC humanas de acuerdo con el método general 1. Durante este periodo se crearon combinaciones de anticuerpos biespecíficos o bivalentes o mezclas diluyendo cantidades equimolares (200 nM) de Fab'A-X (Fab-scFv) y/o Fab'B-Y (Fab-péptido) con una especificidad para antígeno para las proteínas de la superficie celular, antígeno 4 y antígeno 2 en DMEM que contenía suero de ternera al 10 % y glutamina 2 mM. Estas combinaciones se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Cuadrícula de biespecíficos, bivalentes o mezclas con especificidad para antígeno 4 y 2

(A-X) Fab A	(B-Y) Fab B	
	antígeno 2-X	antígeno 2-Y
antígeno 4-Y	2-X:Y-4	4-Y Y-2
antígeno 2-X	-	2-X:Y-2
donde X es un scFv (52SR4) e Y es un péptido (GCN4)		

Los Fab'A-X y/o Fab'B-Y se incubaron de acuerdo con el método general 2. A continuación, las células se tiñeron de acuerdo con el método general 3.

Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de Akt y PLCg2 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células).

Las Figuras 15 y 16 muestran que solo la combinación biespecífica del antígeno 4 (VR4248) y un anti-antígeno 2 (VR4246), pero no de las mezclas de anticuerpos anti-antígeno 4 (VR4248) y anti-antígeno 2 (VR4246), inhibieron la expresión de Akt fosforilada y de PLCg2 (los datos representan valores medios y las barras de error son intervalos de confianza del 95 %).

Con el fin de validar la inhibición observada con la combinación biespecífica de un anti-antígeno 4 (VR4248) y un

anticuerpo anti-antígeno 2 (VR4246), esta combinación se tituló en un sistema de ensayo que medía la expresión de CD86 inducida por anti-IgM en las células B.

Como puede verse en la Figura 17, una titulación de la combinación de antígeno 4-X/antígeno 2-Y fue capaz de inhibir la expresión de CD86 inducida por anti-IgM en las células B después de 24 horas. La CI_{50} , extrapolada mediante un ajuste de curva logística de 4 parámetros utilizando Graphpad Prism 6, fue de 4,7 nM (los datos representan valores medios y las barras de error son desviaciones típicas).

Ejemplo 11 Caracterización del complejo biespecífico

Purificación de reactivos de cribado funcional: Los formatos de cribado funcional Fab-X (Fab-scFv-His) y Fab-Y (Fab-péptido-His) se purificaron de la siguiente manera tras la expresión convencional de CHO. Los sobrenadantes de los cultivos celulares clarificados se filtraron de forma estéril con un tamaño de 0,22 μ m utilizando un recipiente estéril de 1 l. Se midió el pH y, en caso necesario, se ajustó a pH 7,4. Los sobrenadantes preparados se cargaron a 5 ml/min en columnas HisTrap Nickel Excel (GE Healthcare) de 5 ml equilibradas en fosfato de sodio 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4. Las columnas fueron lavadas con imidazol 15 mM, fosfato de sodio 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4, y después se eluyeron con imidazol 250 mM, fosfato de sodio 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4. A la elución le siguió absorbancia a 280 nm y se recogió el pico de elución. Las eluciones de pico se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSKgel G3000SWXL; 5 μ m, 7,8x300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm. Las muestras de pureza suficiente se concentraron a >1m/ml y se diafiltraron en PBS pH 7,4 (Sigma Aldrich Chemicals) utilizando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugando a 4000 xg en un rotor oscilante. Cuando la calidad del producto no era suficiente, las eluciones de la columna de níquel se concentraron y se aplicaron a una columna XK16/60 o XK16/60 Superdex200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS, pH 7,4 (Sigma Aldrich Chemicals). Las columnas se desarrollaron con un gradiente isocrático de PBS, pH 7,4 (Sigma Aldrich Chemicals) a 1 ml/min o 2,6 ml/min, respectivamente. Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSKgel G3000SWXL; 5 μ m, 7,8x300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm. Las fracciones seleccionadas se agruparon y concentraron a >1mg/ml utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugación a 4000 xg en un rotor oscilante.

Análisis de la formación de biespecíficos en solución

Experimento 1

El Fab-X purificado (VR4247) y el Fab-Y purificado (VR4248) se mezclaron en una relación molar de uno a uno, con una concentración total de proteína de 500 μ g/ml y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Los controles consistieron en las partes individuales de la mezcla a la misma concentración que estarían en la mezcla. Se inyectaron 100 μ l de la muestra y de cada control en una columna TSKgel G3000SWXL; 5 μ m, 7,8x300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min. La detección se realizó por absorbancia a 280 nm (véase la Figura 18).

Los cromatogramas de exclusión por tamaños de la Figura 18 muestran que el control Fab-X (VR4247) tiene un pico principal del 92 % del área total del pico con un tiempo de retención de 8,610 minutos métricos. El control Fab-Y (VR4248) tiene un pico principal del 94 % del área total del pico con un tiempo de retención de 10,767 minutos métricos. Los tiempos de retención medidos para los controles Fab-X y Fab-Y se convirtieron en pesos moleculares aparentes de 95 kDa y 35 kDa respectivamente utilizando una curva estándar creada a partir de los tiempos de retención de los estándares de filtración en gel de BioRad (151-1901) ejecutados en las mismas condiciones. Estos pesos moleculares aparentes son consistentes con los pesos moleculares aparentes esperados para las moléculas Fab-scFv y Fab-péptido. El pico principal de la mezcla Fab-X (VR4247)/Fab-Y (VR4248) tiene un tiempo de retención de 9,289 minutos métricos. Esto se convierte, como en el caso anterior, en un peso molecular aparente de 187 kDa. Este peso molecular aparente es consistente con el esperado para el emparejamiento de un Fab-X (VR4247) con un Fab-Y (VR4248). El pico principal es también el 84 % del área total del pico, lo que sugiere que la mayor parte del Fab-X (VR4247) y del Fab-Y (VR4248) han formado el complejo proteico biespecífico 1 a 1. El pequeño hombro adicional y pico que se eluyen después del pico principal son consistentes con los materiales de partida Fab-X (VR4247) y Fab-Y (VR4248).

Experimento 2

El Fab-X purificado (VR4130) y el Fab-Y (VR4131) se mezclaron en una relación molar de uno a uno, con una concentración total de proteína de 500 μ g/ml. A continuación, se diluyeron alícuotas de esta mezcla con PBS pH 7,4 a una concentración de 50 μ g/ml y 5 μ g/ml. También se establecieron controles que consistían en las partes individuales de la mezcla a la misma concentración que estarían en la mezcla de 500 μ g/ml. Todas las mezclas y controles se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Se inyectaron 100 μ l de todas las muestras y controles en una columna TSKgel G3000SWXL; 5 μ m, 7,8x300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min. La detección se realizó por absorbancia a 214 nm (véanse la Figura 19, la Figura 20 y la Tabla 11).

Los cromatogramas de exclusión por tamaños de la Figura 19 muestran que el control Fab-X (VR4130) tiene un pico principal del 91 % del área total del pico con un tiempo de retención de 8,634 minutos métricos. El control Fab-Y (VR4131) tiene un pico principal del 97 % del área total del pico con un tiempo de retención de 9,361 minutos métricos. Los tiempos de retención medidos para los controles Fab-X y Fab-Y se convirtieron en pesos moleculares aparentes de 109 kDa y 55 kDa respectivamente utilizando una curva estándar creada a partir de los tiempos de retención de los estándares de filtración en gel de BioRad (151-1901) ejecutados en las mismas condiciones. Estos pesos moleculares aparentes son consistentes con los pesos moleculares aparentes esperados para las moléculas Fab-scFv y Fab-péptido. El pico principal de la mezcla Fab-X (VR4130)/Fab-Y (VR4131) tiene un tiempo de retención de 8,016 minutos métricos. Esto se convierte, como en el caso anterior, en un peso molecular aparente de 198 kDa. Este peso molecular aparente es consistente con el esperado para el emparejamiento de un Fab-X (VR4130) con un Fab-Y (VR4131). El pico principal es también el 82 % del área total del pico, lo que sugiere que la mayor parte del Fab-X (VR4130) y del Fab-Y (VR4131) han formado el complejo proteico 1 a 1. Los dos pequeños picos que se eluyen después del pico principal son consistentes con los materiales de partida Fab-X (VR4130) y Fab-Y (VR4131).

Los cromatogramas de exclusión por tamaños en la Figura 20 son para las mezclas Fab-X (VR4130)/Fab-Y (VR4131) 1 a 1 a una concentración de 500 µg/ml, 50 µg/ml y 5 µg/ml. Todas los trazos son similares con picos correspondientes entre muestras que tienen tiempos de retención similares y alturas y áreas de picos relativos similares. El porcentaje de área del pico se recopila en la Tabla 11, donde el % de cada pico permanece bastante constante tras la dilución de la mezcla. Esto indica que el complejo Fab-X/Fab-Y 1 a 1 permanece como un complejo en todas las concentraciones analizadas. El 75 % de Fab-X y Fab-Y están presentes como el complejo 1 a 1 incluso cuando la mezcla se diluye a 5 µg/ml, lo que equivale a una concentración de 40 nM para el complejo.

Tabla 11: Datos del área del pico de exclusión por tamaños para mezclas Fab-X (VR4130)/Fab-Y (VR4131) de relación molar 1:1 a 500 µg/ml, 50 µg/ml y 5 µg/ml. Los picos se detectaron a una absorbancia de 214 nm.

Concentraciones		% de área de pico		
µg/ml	nM	complejo Fab-X (VR4130)/Fab-Y (VR4131) 1 a 1	Fab-X (VR4130)	Fab-Y (VR4131)
500	4000	82 %	4 %	5 %
50	400	81 %	11 %	3 %
5	40	75 %	21 %	3 %

Así pues, los resultados de estos experimentos indican que una alta proporción de las proteínas de fusión Fab-X y Fab-Y forman los complejos biespecíficos deseados, con una proporción mínima de monómeros sobrantes y sin evidencia de formación de homodímeros.

Ejemplo 12: Cribado en cuadrícula de grandes paneles de complejos proteicos enlazados heterodiméricamente para identificar dianas de anticuerpos biespecíficos novedosas.

Introducción: Tras la validación satisfactoria del formato biespecífico y del método de cribado en los ejemplos anteriores, el cribado se amplió a un mayor número de pares de antígenos. Se generó un panel de pares de regiones variables (V) de anticuerpos para 23 antígenos diferentes expresados en células B. Utilizando el formato Fab-Kd-Fab [es decir, A-X:Y-B en donde A y B son fragmentos Fab] se formó una cuadrícula de complejos proteicos enlazados heterodiméricamente que representaban múltiples combinaciones de regiones V de cada una de las 315 combinaciones de pares de antígenos diferentes. Estas combinaciones se cribaron para determinar su capacidad de modular la señalización de BCR (receptor de células B) en un ensayo de citometría de flujo de alto rendimiento para seleccionar pares de dianas novedosas para la intervención con un anticuerpo biespecífico.

Inmunización: El ADN que codifica los antígenos seleccionados se obtuvo mediante síntesis génica o fuentes comerciales y se clonó en un vector de expresión con un promotor constitutivo fuerte. El ADN plasmídico se transfeció en células de fibroblastos de conejo Rab-9 (ATCC® CRL-1414™) utilizando un sistema de electroporación propio. Veinticuatro horas después, se comprobaron las células para la expresión del antígeno en las mediante citometría de flujo y se congelaron en alícuotas en nitrógeno líquido hasta su uso. Se inmunizaron hasta 6 antígenos por conejo, ya sea mediante la coexpresión en la misma célula o haciendo mezclas de células transfectadas de forma individual o múltiple. Los conejos fueron inmunizados con 3 dosis de células.

Descubrimiento de anticuerpos: Los cultivos de células B se prepararon utilizando un método similar al descrito por Zubler *et al.* (1985). Brevemente, las células B derivadas del bazo o de las PBMC de los conejos inmunizados se cultivaron a una densidad de aproximadamente 2000-5000 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos con código de barras con 200 µl/pocillo de medio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con FCS al 10 % (PAA laboratories ltd), 2 % de HEPES (Sigma Aldrich), 1 % de L-Glutamina (Gibco BRL), solución de penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco BRL), 0,1 % de β-mercaptoetanol (Gibco BRL), 3 % de sobrenadante de cultivo

de esplenocitos activados y células de timoma murino mutante EL4 irradiadas con rayos gamma (5×10^4 /pocillo) durante siete días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

La presencia de anticuerpos específicos para antígeno en los sobrenadantes de cultivo de células B se determinó mediante un ensayo de unión homogéneo basado en la fluorescencia utilizando células HEK293 cotransfectadas con los antígenos con los que se inmunizó a los conejos. El cribado consistió en transferir 10 µl de sobrenadante de placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos con código de barras a placas de ensayo de 384 pocillos con paredes negras con códigos de barras que contenían células HEK293 transfectadas con el antígeno diana (aproximadamente 3000 células/pocillo) utilizando un manipulador de líquidos Matrix Platemate. La unión se reveló con un conjugado Cy-5 específico para Fcy de IgG anti-conejo de cabra (Jackson). Las placas se leyeron en un sistema de detección celular Applied Biosystems 8200.

Después del cribado primario, los sobrenadantes positivos se consolidaron en placas maestras de 96 pocillos con código de barras utilizando un robot de selección de aciertos Aviso Onyx y células B en placas de cultivo celular congeladas a -80 °C. A continuación, las placas maestras se cribaron en un ensayo de unión homogéneo basado en la fluorescencia en células HEK293 transfectadas con antígenos por separado y perlas Superavidin™ (Bangs Laboratories) recubiertas con proteína recombinante como fuente de antígeno. Esto se hizo con el fin de determinar la especificidad del antígeno para cada pocillo.

Para permitir la recuperación de los genes de la región variable del anticuerpo de una selección de pocillos de interés, se realizó una etapa de deconvolución para permitir la identificación de las células B específicas del antígeno en un pocillo dado que contenía una población heterogénea de células B. Esto se logró utilizando el método de focos fluorescentes (Clargo *et al.*, 2014. Mabs 1 de enero de 2014: 6(1) 143-159; EP1570267B1). Brevemente, las células B secretoras de inmunoglobulina de un pocillo positivo se mezclaron con células HEK293 transfectadas con el antígeno diana o con perlas de estreptavidina (New England Biolabs) recubiertas con antígeno diana biotinilado y una dilución final de 1:1200 de un conjugado FITC específico para el fragmento Fcy de cabra anti-conejo (Jackson). Después de la incubación estática a 37 °C durante 1 hora, las células B específicas del antígeno pudieron ser identificadas debido a la presencia de un halo fluorescente alrededor de esa célula B. Varios de estos clones de células B individuales, identificados con un microscopio Olympus, se recogieron con un micromanipulador Eppendorf y se depositaron en un tubo de PCR. El método de los focos fluorescentes también se utilizó para identificar células B específicas de antígeno a partir de una población heterogénea de células B directamente de la médula ósea de conejos inmunizados.

Los genes de la región variable de los anticuerpos se recuperaron a partir de células individuales mediante la transcripción inversa (RT)-PCR utilizando cebadores específicos de la región variable de la cadena pesada y ligera. Se realizaron dos rondas de PCR, con la PCR secundaria anidada que incorporaba sitios de restricción en los extremos 3' y 5', permitiendo la clonación de la región variable en vectores de expresión de mamífero Fab-X y Fab-Y de ratón (VH) o kappa de ratón. Las construcciones de cadenas pesadas y ligeras para los vectores de expresión Fab-X y Fab-Y se cotransfectaron en células HEK-293 utilizando Fectin 293 (Life Technologies) o en células Expi293 utilizando ExpiFectamine (Life Technologies) y el anticuerpo recombinante se expresó en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos en un volumen de 5 ml. Después de 5-7 días de expresión, se recogieron los sobrenadantes. Los sobrenadantes se analizaron en un ensayo de unión homogéneo basado en fluorescencia en células HEK293 transfectadas con antígeno y perlas Superavidin™ (Bangs Laboratories) recubiertas con proteína recombinante o células HEK transfectadas con antígeno. Esto se hizo para confirmar la especificidad de los anticuerpos clonados.

Producción de Fab A-X y Fab B-Y a pequeña escala (Transfección de Expi293 a pequeña escala (50 ml))

Las células Expi293 se subcultivaron de forma rutinaria en medio de expresión Expi293™ hasta una concentración final de $0,5 \times 10^6$ células viables/ml y se incubaron en una incubadora con agitación orbital (Multitron, Infors HT) a 120 rpm CO₂ al 8 % y 37 °C.

En el día de la transfección se midió la viabilidad y la concentración de las células utilizando un contador de células automatizado (Vi-CELL, Beckman Coulter). Para conseguir una concentración celular final de $2,5 \times 10^6$ células viables/ml se añadió el volumen adecuado de suspensión celular a un matraz de agitación Erlenmeyer estéril de 250 ml y se llevó hasta el volumen de 42,5 ml añadiendo medio de expresión Expi293™ fresco y precalentado para cada 50 ml de transfección.

Para preparar los complejos lípido-ADN para cada transfección, se diluyó un total de 50 µg de ADN plasmídico de cadena pesada y de cadena ligera en medio Opti-MEM® I (Life Technologies) hasta un volumen total de 2,5 ml y se diluyeron 135 µl de reactivo ExpiFectamine™ 293 (Life Technologies) en medio Opti-MEM® I hasta un volumen total de 2,5 ml. Todas las diluciones se mezclaron con cuidado y se incubaron durante no más de 5 minutos a temperatura ambiente antes de añadir cada solución de ADN al respectivo reactivo ExpiFectamine™ 293 diluido para obtener un volumen total de 5 ml. Las mezclas de ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293 se mezclaron con cuidado y se incubaron durante 20-30 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formaran los complejos de ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293.

Una vez finalizada la incubación del complejo ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293, se añadieron los 5 ml de complejo

ADN-reactivo-ExpiFectamine™ 293 a cada matraz de agitación. Los matraces de agitación se incubaron en una incubadora de agitación orbital (Multitron, Infors HT) a 120 rpm, CO₂ al 8 % y 37 °C.

Aproximadamente 16-18 horas después de la transfección, se añadieron 250 µl de ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 1 (LifeTechnologies) y 2,5 ml de ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 2 (LifeTechnologies) a cada matraz de agitación.

Los cultivos celulares se cosecharon 7 días después de la transfección. Las células se transfirieron a tubos de centrifugación de 50 ml (Falcon) y se centrifugaron durante 30 minutos a 4000 rpm, seguido de una filtración estéril a través de un Stericup de 0,22 µm (Merck Millipore). Los sobrenadantes clarificados y filtrados estérilmente se almacenaron a 4 °C. Los niveles finales de expresión se determinaron mediante Protein G-HPLC.

Purificación a pequeña escala (50 ml): Tanto Fab-X como Fab-Y se purificaron por separado mediante captura por afinidad utilizando un sistema de purificación a pequeña escala basado en el vacío. Brevemente, los 50 ml de sobrenadantes de cultivo se filtraron estérilmente a 0,22 µm antes de añadir 500 µl de perlas de Ni Sefarosa (GE Healthcare). La mezcla de perlas sobrenadantes se hizo girar durante aproximadamente una hora antes de eliminar el sobrenadante aplicando vacío. Las perlas se lavaron entonces con Lavado 1 (fosfato de sodio 50 mM NaCl 1 M pH 6,2) y Lavado 2 (NaCl 0,5 M). La elución se realizó con acetato de sodio 50 mM, pH 4,0 + NaCl 1 M. El tampón de las fracciones eluidas se intercambió en PBS (Sigma), pH 7,4 y se filtró con un tamaño de 0,22 µm. Los grupos finales se evaluaron mediante barrido A280, SE-UPLC (método BEH200), SDS-PAGE (reducido y no reducido) y para la endotoxina utilizando el sistema PTS Endosafe.

Ensayos de cribado

Las PBMC de los donantes se descongelaron rápidamente utilizando un baño de agua establecido a 37 °C y se transfirieron cuidadosamente a un tubo Falcon de 50 ml. A continuación, se diluyeron gota a gota hasta 5 ml en un medio de ensayo para minimizar el choque osmótico. Luego se diluyeron las células hasta 20 ml con cuidado antes de añadir el medio diluyente final para que el volumen fuera de 50 ml. Las células se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos antes de eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de medio. Acto seguido, se contaron las células y se diluyeron a $1,66 \times 10^6$ células/ml antes de dispensar 30 µl por pocillo en una placa de TC de fondo en V, lo que supuso una concentración final de ensayo de $5,0 \times 10^4$ células/pocillo. A continuación, la placa de células se almacenó cubierta en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % hasta que se necesitó, dándoles un mínimo de 1 hora para reposar.

Los reactivos Fab-X y Fab-Y se mezclaron en una relación equimolar a 5x la concentración final del ensayo en el medio de ensayo y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las muestras se prepararon en una placa de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U y se cubrieron durante la incubación. Se añadieron 10 µl de la mezcla 5x Fab-KD-Fab a los pocillos de ensayo apropiados que contenían células y se mezclaron agitando a 1000 rpm durante 30 segundos antes de incubarse durante 90 min a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Las células se estimularon a continuación con 10 µl de IgM anti-humana. La concentración final del ensayo del estímulo varió en función de las lecturas del panel de ensayo, los tres cócteles de anticuerpos A, B y C (detallados a continuación) se estimularon a una concentración final de ensayo de 50 µg/ml (cóctel A y C) o 25 µg/ml (cóctel B). Las placas de ensayo se mezclaron entonces suavemente a 1000 rpm durante 30 segundos antes de la incubación a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 5 minutos (cóctel de anticuerpos A y C) o 2 minutos (cóctel de anticuerpos B). El ensayo se detuvo añadiendo 150 µl de BD CytoFix enfriado con hielo en todos los pocillos y se incubó durante 15 minutos a TA. A continuación, las células fijadas se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos para sedimentar las células y permitir la eliminación del sobrenadante utilizando un lavador de placas BioTek ELx405.

El sedimento se volvió a suspender agitando vorticialmente la placa a 2400 rpm durante 30 segundos. A continuación, las células se permeabilizaron a 4 °C añadiendo 100 µl de tampón de permeabilización celular BD III congelado en frío durante 30 minutos. Las células se lavaron entonces con 100 µl de tampón FACS y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó de nuevo con el ELx405 antes de utilizarlo para dispensar rápidamente 200 µl de tampón FACS para lavar cualquier tampón de permeabilización residual. Las células se volvieron a centrifugar a 500 g y el sobrenadante se eliminó por inversión. Durante la etapa de centrifugado anterior se preparó el cóctel de anticuerpos en tampón FACS y se mantuvo protegido de la luz. Las células se volvieron a suspender acto seguido mediante agitación vorticial (2400 RPM, 30 segundos) antes de añadir 20 µl de cóctel de anticuerpos a todos los pocillos y agitar la placa durante 30 segundos a 1000 rpm. Después, las células se incubaron durante 60 minutos a TA en la oscuridad.

Las células se lavaron entonces dos veces en 200 µl de tampón FACS con un centrifugado de 500 g y se eliminó el sobrenadante después de cada etapa. Por último, las células se volvieron a suspender mediante una agitación vorticial durante 30 segundos a 2400 rpm antes de añadir 20 µl finales de tampón FACS. A continuación, se leyeron las placas en el instrumento Intellicyt HTFC/iQue.

Tampón FACS = PBS + ASB al 1 % + 0,05 % de NaN₃ + EDTA 2 mM

Cóctel de anticuerpos A = 1:2 CD20 PerCp-Cy5.5 (BD Biosciences) +1:5 PLCy2 AF88 + 1:10 Akt AF647 + 1:50 ERK1/2 PE (diluido en tampón FACS).

- 5 Cóctel de anticuerpos B = 1:2 CD20 PerCp-Cy5.5 (BD Biosciences) +1:5 Syk PE +1:5 BLNK AF647 (diluido en tampón FACS)

Cóctel de anticuerpos C = 1:5 CD20 PerCp-Cy5.5 (Biolegend) + 1:5 PLCy2 AF488 + 1:10 Akt AF647 + 1:5 Syk PE (diluido en tampón FACS)

10

Reactivo	Proveedor	Número de catálogo
IgM anti-humana	Southern Biotech	2022-14
CytoFix	BD Biosciences	554655
Tampón de perm. III	BD Biosciences	558050
Anti Akt (pS473) AF647	BD Biosciences	561670
Anti SYK (pY348) PE	BD Biosciences	558529
Anti PLCy2 (pY759) AF488	BD Biosciences	558507
Anti-BLNK(pY84) AF647	BD Biosciences	558443
Anti ERK1/2 (pT202/pY204) PE	BD Biosciences	561991
CD20 anti-humano PerCp-Cy5.5	BD Biosciences	558021
CD20 anti-humano AF488	BD Biosciences	558056
CD20 anti-humano PerCp-Cy5.5	Biolegend	340508
Solución salina tamponada con fosfato (PBS)	Fisher Scientific	10562765
RPMI 1640	Life Technologies	31870
Suero fetal bovino (SFB)	Life Technologies	16140
Glutamax	Life Technologies	35050
Penicilina/Estreptomicina (P/E)	Life Technologies	15070
EDTA	Sigma	03690
Azida de sodio (NaN ₃)	Sigma	S2002
Seroalbúmina bovina (SAB)	Sigma	A1470

Las combinaciones Fab-X + Fab-Y se examinaron con el cóctel de anticuerpos A y B o C solo. Todos los cribados se realizaron en células cónicas de 2 donantes de sangre diferentes. Los datos se recopilaron y evaluaron utilizando herramientas de software disponibles comercialmente. Se cribaron un total de 2500 combinaciones Fab-X + Fab-Y con 315 combinaciones de antígenos diferentes.

15

Resultados

Se calculó el porcentaje de inhibición de la inducción de la fosforilación de las proteínas de la cascada de señalización de BCR por cada combinación Fab-Kd-Fab [es decir, A-X:Y-B donde A y B son fragmentos Fab], en este ejemplo buscando nuevas combinaciones de antígenos que inhiban la función de las células B, el criterio para una combinación positiva se fijó en al menos un 30 % de inhibición de al menos dos lecturas de fósforo por al menos una combinación de regiones V. De acuerdo con este umbral, 11 nuevas combinaciones de pares de antígenos de las 315 examinadas cumplían los criterios requeridos. Esto representa una tasa de aciertos del 3,5 %, lo que demuestra la importancia de examinar un gran número de combinaciones para encontrar las de actividad deseada.

25

Las Figuras 21-23 muestran los datos de las especificidades cruzadas de la cuadrícula de antígenos. Los valores son el porcentaje de inhibición (valor negativo para la activación) de la fosforilación de Syk, PLCg2 y AKT respectivamente y representan la media de múltiples combinaciones de regiones V evaluadas. Se analizaron 315 combinaciones diferentes de antígenos y, como puede verse, el efecto sobre la señalización de BCR de las diferentes combinaciones de anticuerpos varió significativamente desde una fuerte inhibición, p. ej., el antígeno 2 en Fab-X combinado con los

30

antígenos 3 y 4 en Fab-Y (69,66 % y 70,4 % de inhibición de la fosfo Syk Figura 21) hasta la activación, por ejemplo, el antígeno 6 en X y el antígeno 11 en Y (menos 118,10 % de fosfo Syk Figura 21).

Cada punto de datos que representa los valores porcentuales medios representados en las Figuras 21-23 se muestra para el antígeno 2 en Fab-X y el antígeno 3 en Fab-Y en la Figura 24. En este caso, se evaluaron 23 combinaciones diferentes de distintas regiones V de anticuerpos. La misma combinación de antígenos pero en orientación alternativa, es decir, el antígeno 2 en Fab-Y y el antígeno 3 en Fab-X se muestra en la Figura 25. En este caso, se evaluaron 9 combinaciones diferentes de distintas regiones V de anticuerpos. Todas las regiones V muestran inhibición, pero ventajosamente este método también puede utilizarse en la selección de combinaciones óptimas de regiones V.

De manera similar, cada punto de datos que representa los valores porcentuales medios representados en las Figuras 21-23 se muestra para la combinación de antígeno 2 en Fab-X y antígeno 4 en Fab-Y en la figura 26. En este caso, se evaluaron 10 combinaciones diferentes de distintas regiones V de anticuerpos. La misma combinación de antígenos pero en orientación alternativa, es decir, el antígeno 2 en Fab-Y y el antígeno 4 en Fab-X se muestra en la Figura 27. En este caso, se evaluaron 6 combinaciones diferentes de distintas regiones V de anticuerpos. De nuevo, todas las regiones V muestran inhibición, pero las combinaciones óptimas de regiones V pueden identificarse y seleccionarse utilizando el método.

Ejemplo 13 - Evaluación de complejos proteicos enlazados heterodiméricamente expresados de forma transitoria para evaluar si el cribado en cuadrícula de FabA-X: Y-FabB puede identificar dianas de anticuerpos biespecíficos novedosas sin recurrir a la purificación de proteínas

Introducción: Las regiones V para 2 antígenos diferentes, 2 y 3 que inhiben la señalización de células B como un anticuerpo biespecífico que se identificaron usando el formato de Fab-Kd-Fab [FabA-X: Y-FabB] y cribado en cuadrícula de complejos proteicos enlazados heterodiméricamente se expresaron de forma transitoria como FabA-X y FabB-Y. Se comparó la actividad de la combinación expresada de forma transitoria (sin purificación subsiguiente) de FabA-X y FabB-Y purificado para evaluar si el cribado en cuadrícula podía realizarse con los productos directos de la expresión transitoria en lugar de los componentes purificados.

Inmunización: La preparación de las células que expresan antígeno y la inmunización de los conejos se llevó a cabo de la misma manera que se describe en el Ejemplo 12.

Descubrimiento de anticuerpos

Los cultivos de células B se prepararon de la misma manera que se describe en el Ejemplo 12.

El cribado de anticuerpos específicos para antígeno en sobrenadantes de cultivos celulares B y la etapa de deconvolución para la identificación de células B específicas para antígeno se determinó de la misma manera que se describe en el Ejemplo 12.

Los genes de la región variable de los anticuerpos se recuperaron a partir de células individuales mediante la transcripción inversa (RT)-PCR utilizando cebadores específicos de la región variable de la cadena pesada y ligera. Se realizaron dos rondas de PCR, con la 2ª PCR anidada que incorporaba sitios de restricción en los extremos 3' y 5', permitiendo la clonación de la región variable en vectores de expresión de mamífero Fab-X y Fab-Y de ratón (VH) o kappa (VL) de ratón. A continuación, se realizó una 3ª PCR que permitió combinar las regiones variables amplificadas, el fragmento promotor del CMV humano y el fragmento constante pesado de gamma 1 de conejo o el fragmento constante kappa de conejo para generar fragmentos de PCR transcripcionalmente activos (TAP) pesados y ligeros por separado. Estos fragmentos de ADN se utilizaron directamente para la expresión recombinante de anticuerpos IgG de conejo de longitud completa en células HEK-293 utilizando 293Fectin (Life Technologies) o en células Expi293 utilizando Expifectamine (Life Technologies).

Los anticuerpos recombinantes resultantes se cribaron entonces para detectar la unión del antígeno mediante un ensayo de unión homogéneo basado en la fluorescencia en células HEK-293 transfectadas con antígeno y perlas Superavidin™ (Bangs Laboratories) recubiertas con proteína recombinante. Una vez confirmada la especificidad con los TAP transitorios, los genes de los anticuerpos se clonaron en vectores de expresión Fab-X y Fab-Y. Las construcciones de cadenas pesadas y ligeras se cotransfectaron en células HEK-293 utilizando Fectin 293 (Life Technologies) o en células Expi293 utilizando Expifectamine (Life Technologies) y el anticuerpo recombinante se expresó en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos en un volumen de 5 ml. Después de 5-7 días de expresión, se recogieron los sobrenadantes. Los sobrenadantes se analizaron en un ensayo de unión homogéneo basado en fluorescencia en células HEK293 transfectadas con antígeno y perlas Superavidin™ (Bangs Laboratories) recubiertas con proteína recombinante o células HEK transfectadas con antígeno. Esto se hizo para confirmar la especificidad de los anticuerpos clonados.

Producción de sobrenadantes transitorios que contienen Fab-X y Fab-Y

Se utilizó el mismo método de transfección de Expi293 descrito en el Ejemplo 12 para producir los sobrenadantes

transitorios que contienen Fab-X y Fab-Y.

Producción de Fab-X y Fab-Y purificados

- 5 Las células CHOSXE en suspensión se preadaptaron al medio CDCHO (Invitrogen) suplementado con glutamax 2 mM (100x). Las células se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico agitadas a 140 rpm en una incubadora con agitador (Kuner AG, Birsfelden, Suiza) y se cultivaron a 37 °C suplementadas con CO₂ al 8 %.
- 10 Antes de la transfección, se determinó el número de células y su viabilidad mediante un contador celular CEDEX (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania) y se transfirió la cantidad necesaria de células (2x10⁸ células/ml) a tubos cónicos de centrífuga y se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 minutos. Las células sedimentadas se volvieron a suspender en una solución de sales balanceadas de Earl estériles y se centrifugaron a 1400 rpm durante otros 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se volvieron a suspender los sedimentos hasta alcanzar la densidad celular deseada.
- 15 Se mezcló el ADN del vector a una concentración final de 400 ug para 2x10⁸ células/ml y se pipetearon 800 µl en cubetas (Biorad) y se electroporaron utilizando el sistema de electroporación propio.
- 20 Las células transfectadas se transfirieron directamente a frascos Erlenmeyer de 1x3 l que contenían medio ProCHO 5 enriquecido con glutamax 2 mM y solución antimetabólica antibiótica (100x) (1 en 500) y las células se cultivaron en una incubadora con agitación Kuhner a 37 °C, CO₂ al 5 % y 140 rpm de agitación. Se añadió un suplemento alimenticio de 2 g/l de ASF (AJINOMOTO) a las 24 horas después de la transfección y la temperatura cayó a 37 °C durante otros 13 días de cultivo. En el cuarto día, se añadió butirato de sodio 3 mM (sal sódica de ácido n-butírico, Sigma B-5887) al cultivo.
- 25 En el día 14, los cultivos se transfirieron a tubos y el sobrenadante se separó de las células tras centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm. Los sobrenadantes retenidos se filtraron de nuevo a través de SARTOBRAN® P Millipore de 0,22 µm seguido de filtros de oro Gamma de 0,22 µm. Los niveles finales de expresión se determinaron mediante Protein G-HPLC.
- 30 Los Fab-X y Fab-Y se purificaron por captura de afinidad utilizando los sistemas AKTA Xpress y las columnas de níquel preempaquetadas HisTrap Excel (GE Healthcare). Los sobrenadantes del cultivo se filtraron de forma estéril con un tamaño de 0,22 µm y se ajustó el pH a neutro, si es necesario, con ácido o base débil antes de cargarlos en las columnas. Una etapa de lavado secundario, que contenía imidazol 15-25 mM, se utilizó para desplazar de la resina de níquel cualquier proteína unida débilmente de la célula hospedadora/aglutinantes His no específicos. La elución se realizó con fosfato sódico 10 mM, pH 7,4 + NaCl 1 M + imidazol 250 mM y se recogieron fracciones de 2 ml. Un volumen de columna en la elución del sistema se pausó durante 10 minutos para fijar el pico de elución, y consecuentemente reducir el volumen de elución total. Se agruparon las fracciones más limpias eluidas y se intercambió el tampón en PBS (Sigma), pH 7,4 y se filtraron con un tamaño de 0,22 µm. Los grupos finales se evaluaron mediante barrido A280, SE-HPLC (método G3000), SDS-PAGE (reducido y no reducido) y para la endotoxina utilizando el sistema PTS
- 35 Endosafe.
- 40

Ensayos funcionales

- 45 Ensayo de marcadores de activación: Fab'-Y específico para antígeno 2 y Fab'-X específico para antígeno 3, purificado o en sobrenadante transitorio, se incubaron en conjunto durante 60 minutos (en un entorno de 37 °C y CO₂ al 5 %) a una concentración equimolar. Las combinaciones se titularon a partir de una molaridad inicial de 185 nM, en diluciones en serie de 1:4. También se incluyó un sobrenadante simulado, titulado a partir del puro. En placas de 96 pocillos con fondo en V, se añadieron 1,5x10⁵ PBMC a los pocillos, a los que se añadieron las combinaciones Fab'-X y Fab'-Y tituladas o el sobrenadante simulado. Las combinaciones y las células se incubaron en conjunto durante otros 90 minutos. Después de este tiempo, las células B se activaron mediante la adición de 12,5 µg/ml de IgM anti-humano F(ab')₂ de cabra (Southern Biotechnology) durante 24 horas a 37 °C más CO₂ al 5 %.
- 50 A los pocillos se añadieron 100 µl de tampón FACS enfriado en hielo (PBS + SAB al 1 % + 0,1 % de NaN₃ + EDTA 2 mM), las placas se sellaron y se cubrieron con hielo húmedo durante aproximadamente 15 minutos, antes de centrifugar a 500xg durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el exceso de sobrenadante de los sedimentos celulares y se agitaron las placas a 2000 rpm durante 30 segundos.
- 55 A continuación, las células se tiñeron con un cóctel de anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD71 marcados con fluorescencia (BD Biosciences). Las placas se agitaron brevemente y se incubaron durante 1 hora sobre hielo húmedo en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en 20 µl de tampón FACS. La expresión celular de CD19, CD20 y CD71 se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt iQUE® Screener.
- 60 Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de CD71 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM)
- 65

menos el fondo (solo células).

Ensayo PhosFlow: Fab'-Y específico para antígeno 2 y Fab'-X específico para antígeno 3, purificado o en sobrenadante transitorio, se incubaron en conjunto durante 60 minutos (en un entorno de 37 °C y CO₂ al 5 %) a una concentración equimolar. Las combinaciones se titularon a partir de una molaridad inicial de 185 nM, en diluciones en serie de 1:4. También se incluyó un sobrenadante simulado, titulado a partir del puro. En placas de 96 pocillos con fondo en V, se añadieron 5,0x10⁴ PBMC a los pocillos, a los que se añadieron las combinaciones Fab'-X y Fab'-Y tituladas o el sobrenadante simulado. Las combinaciones y las células se incubaron en conjunto durante otros 90 minutos. Después de este tiempo, las células B se activaron mediante la adición de 25 µg/ml de IgM anti-humano F(ab')₂ de cabra (Southern Biotechnology) durante 15 horas a 37 °C más CO₂ al 5 %. A continuación se detuvo la reacción de señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytotfix (BD Biosciences). Las placas se dejaron luego a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de la centrifugación a 500 xg durante 5 minutos. Se descartó el exceso de sobrenadante del sedimento celular, que se volvió a suspender en el tampón FACS (PBS + 1 % SAB + 0,01 % de NaN₃ + EDTA 2 mM) y se lavó una vez más. A continuación, las células se volvieron a suspender en tampón Perm III enfriado en hielo (BD Biosciences) durante 30 minutos antes de ser lavadas dos veces en tampón de flujo.

A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD20 marcado con fluorescencia (BD Biosciences) y un anticuerpo anti-fosforilación p38 que reconoce el sitio de fosforilación doble conservado pT180/pY182. A continuación, se volvieron a suspender las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron otras dos veces y se volvieron a suspender en 20 µl de tampón FACS. La expresión celular de CD20 y fosfo-p38 se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt iQUE®.

Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de p38 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células).

Resultados

Ensayo de marcadores de activación: Como puede verse en la Figura 28, los datos muestran que la combinación del antígeno 3 con el antígeno 2, ya sea purificado o procedente del sobrenadante transitorio, puede inhibir la expresión de CD71 en las células B estimuladas con anti-IgM.

Ensayo PhosFlow: Los datos de la Figura 29 muestran que la combinación del antígeno 3 con el antígeno 2, ya sea purificado o procedente del sobrenadante transitorio, puede inhibir la p38 fosforilada en las células B estimuladas con anti-IgM.

La sorprendente capacidad de poder construir los complejos biespecíficos de la presente invención directamente a partir de cultivos expresados de forma transitoria sin recurrir a la purificación permite lograr un cribado de complejos biespecíficos de mayor rendimiento que cuando se utilizan componentes purificados.

Ejemplo 14 - Cribado de las regiones V expresadas de forma transitoria en el antígeno 3 como Fab-X con el Fab-Y anti-antígeno 2 purificado en complejos proteicos enlazados heterodiméricamente para seleccionar las regiones V óptimas del anticuerpo del antígeno 3

Introducción: Se identificaron nuevas regiones V del antígeno 3 que inhiben la señalización de las células B como anticuerpo biespecífico en combinación con las regiones V específicas para el antígeno 2, mediante el cribado en cuadrícula de complejos proteicos enlazados heterodiméricamente. Las regiones V del antígeno 3 se expresaron de forma transitoria como Fab-X y se combinaron con Fab-Y anti-antígeno 2 purificado. Se midió la inhibición de la activación de la señalización de las células B para seleccionar las regiones V del antígeno 3 y del antígeno 2 más potentes.

La preparación de las células que expresan antígeno y la inmunización de los conejos se llevó a cabo de la misma manera que se describe en el Ejemplo 12.

Descubrimiento de anticuerpos: Los cultivos de células B se prepararon de la misma manera que se describe en el Ejemplo 12.

El cribado de anticuerpos específicos para antígeno en sobrenadantes de cultivos celulares B y la etapa de deconvolución para la identificación de células B específicas para antígeno se determinó de la misma manera que en el Ejemplo 12.

Se descubrieron otras regiones variables mediante el método de los focos directos a partir de células B derivadas del bazo y la médula ósea de ratones inmunizados. Brevemente, las células a una densidad final de entre 4x10⁵ y 8x10⁵ células/ml se mezclaron con perlas de estreptavidina (New England Biolabs) recubiertas con antígeno biotinilado y una dilución final de 1:1200 de conjugado FITC específico para fragmento Fcγ anti-ratón de cabra (Jackson). Después

de la incubación estática a 37 °C durante 1 hora, las células B específicas del antígeno pudieron ser identificadas debido a la presencia de un halo fluorescente alrededor de esa célula B. Varios de estos clones de células B individuales, identificados con un microscopio Olympus, se recogieron con un micromanipulador Eppendorf y se depositaron en un tubo de PCR.

Los genes de la región variable de los anticuerpos se recuperaron a partir de células individuales mediante la transcripción inversa (RT)-PCR utilizando cebadores específicos de la región variable de la cadena pesada y ligera. Se realizaron dos rondas de PCR, con la 2ª PCR anidada que incorporaba sitios de restricción en los extremos 3' y 5', permitiendo la clonación de la región variable en vectores de expresión de mamífero Fab-X y kappa (VL) de ratón. A continuación, estos vectores se cotransfectaron en células HEK-293 utilizando 293Fectin (Life Technologies) o en células Expi293 utilizando Expifectamine (Life Technologies) y se dejaron expresar durante 6 días. Los sobrenadantes se analizaron en un ensayo de unión homogéneo basado en fluorescencia en células HEK293 transfectadas con antígeno y perlas Superavidin™ (Bangs Laboratories) recubiertas con proteína recombinante o células HEK transfectadas con antígeno. Esto se hizo para confirmar la especificidad de los anticuerpos clonados.

Además de los sobrenadantes transitorios de Fab-X, los sobrenadantes simulados de control negativo se prepararon de la misma manera utilizando un ADN de control irrelevante.

Los niveles de expresión de Fab-X se determinaron mediante Protein G-HPLC.

Producción de Fab-Y purificado: El Fab-Y purificado se preparó utilizando el mismo método descrito en el Ejemplo 13

Ensayo funcional

Se utilizó el mismo ensayo funcional descrito en el Ejemplo 12, excepto que en lugar de 3 cócteles de anticuerpos diferentes, solo se utilizó un cóctel con las mismas concentraciones de ensayo y condiciones de incubación descritas para el cóctel de anticuerpos A en el Ejemplo 12.

Cóctel de anticuerpos = 1:3 CD20 PerCp-Cy5.5 + 1:5 PLCy2 AF88 + 1:10 Akt AF647 + 1:5 p38 MAPK PE (diluido en tampón FACS).

Resultados

Como puede verse en las Figuras 30-33, los datos muestran que la combinación de diferentes regiones V de ratón de antígeno 3 expresadas de forma transitoria en Fab-X con 2 regiones V de antígeno 2 purificadas diferentes (VR447 y VR4450) en Fab-Y puede inhibir la activación de las células B a diferentes niveles y el cribado, por tanto, facilita la selección de las regiones V óptimas. Las combinaciones con Fab-X transitorio se comparan con una combinación de referencia con un Fab-X purificado (VR4126).

Ejemplo 15 - Comparación de la actividad del antígeno 2 más codireccionamiento del antígeno 3 en formato de cribado Fab-Kd-Fab a un formato BYbe biespecífico ligado molecularmente.

Introducción: Comprobar que la actividad del par de dianas identificada en el complejo de cribado enlazado heterodiméricamente Fab-Kd-Fab podría traducirse en una actividad similar deseada en un formato terapéutico alternativo ligado molecularmente. Se generó especificidad para antígeno 2 (VR4447) y para antígeno 3 (VR4130) en un formato BYbe. Este formato BYbe consiste en las regiones V anti-antígeno 3 (VR4130) como una cadena única (sc) estabilizada por disulfuro (ds) fusionada a la cadena pesada del Fab anti-antígeno 2 (VR4447).

Métodos:

Como se describe en el Ejemplo 13, excepto que la purificación de BYbes para el cribado funcional se realizó de la siguiente manera: Los formatos de BYbe para el cribado funcional (Fab-dsscFv [scFv fuera del extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab]) se purificaron de la siguiente manera. Los sobrenadantes de cultivos celulares clarificados de expresión estándar expiHEK o CHO se filtraron de forma estéril con un tamaño de 0,22 µm. Los sobrenadantes filtrados se cargaron a 2 ml/min en columnas GammabindPlus Sefarosa XK26 de 50 ml (GE Healthcare) equilibradas en PBS pH 7,4 (Sigma Aldrich Chemicals). Tras la carga, las columnas se lavaron con PBS pH 7,4 y luego se eluyeron con Glicina/HCl 0,1 M, pH 2,7. La elución fue seguida por la absorbencia a 280 nm, el pico de elución se recogió, y luego se neutralizó con 1/25 volumen de Tris/HCl 2 M pH 8,5. Las muestras neutralizadas se concentraron utilizando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa (BYbes) y centrifugación a 4000 xg en un rotor oscilante. Las muestras concentradas se aplicaron a una columna XK16/60 o XK26/60 Superdex200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS, pH 7,4. Las columnas se desarrollaron con un gradiente isocrático de PBS, pH 7,4 a 1 ml/min o 2,6 ml/min, respectivamente. Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5 µm, 7,8 X 300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm. Las fracciones monoméricas seleccionadas se agruparon y concentraron a >1 mg/ml utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa y centrifugación a 4000 xg en un rotor oscilante. Las muestras

5 finales se analizaron; para concentración mediante el espectrofotómetro UV-visible de barrido A280 (Cary 50Bio); para el % de monómeros mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5 µm, 7,8x300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm; mediante análisis SDS-PAGE reductor y no reductor en geles de 1,5 mm de Tris-Glicina al 4-20 % (Novex) a 50 mA (por gel) durante 53 minutos; y para la endotoxina mediante el sistema de prueba portátil EndoSafe® de Charles River con cartuchos de prueba de lisado de amebocitos de limulus (LAL).

Ensayos funcionales

- 10 Ensayo de marcadores de activación: Fab'-Y específico para antígeno 2 y Fab'-X específico para antígeno 3, se incubaron en conjunto durante 60 minutos (en un entorno de 37 °C y CO₂ al 5 %) a una concentración equimolar. Las combinaciones se titularon a partir de una molaridad inicial de 100 nM, en diluciones en serie de 1:4. BYbe específico para antígeno 2 y 3 también se tituló a partir de una molaridad inicial de 100 nM, en diluciones en serie de 1:4. En placas de 96 pocillos con fondo en V, se añadieron 1,5x10⁵ PBMC a los pocillos, a los que se añadieron las combinaciones Fab'-X y Fab'-Y tituladas o BYbe titulado. Las combinaciones Fab'-X y Fab'-Y o BYbe se incubaron con las células durante otros 90 minutos. Después de este tiempo, las células B se activaron mediante la adición de 25 µg/ml de IgM anti-humano F(ab')₂ de cabra (Southern Biotechnology) durante 24 horas a 37 °C más CO₂ al 5 %.

- 20 A los pocillos se añadieron 100 µl de tampón FACS enfriado en hielo (PBS + SAB al 1 % + 0,1 % de NaN₃ + EDTA 2 mM), las placas se sellaron y se cubrieron con hielo húmedo durante aproximadamente 15 minutos, antes de centrifugar a 500 xg durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el exceso de sobrenadante de los sedimentos celulares y se agitaron las placas a 2000 rpm durante 30 segundos.

- 25 A continuación, las células se tiñeron con un cóctel de anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 y anti-CD71, anti-CD40 y anti-CD86 marcados con fluorescencia (BD Biosciences). Las placas se agitaron brevemente y se incubaron durante 1 hora sobre hielo húmedo en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en 20 µl de tampón FACS. La expresión celular de CD19, CD20 y CD71, CD40 y CD86 se midió utilizando un citómetro de flujo Intellicyt iQUE® Screener. Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de CD71, CD40 y CD86 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células).

- 35 Ensayo PhosFlow: Fab'-Y específico para antígeno 2 y Fab'-X específico para antígeno 3, se incubaron en conjunto durante 60 minutos (en un entorno de 37 °C y CO₂ al 5 %) a una concentración equimolar. Las combinaciones se titularon a partir de una molaridad inicial de 100 nM, en diluciones en serie de 1:4. BYbe específico para antígeno 2 y antígeno 3 también se tituló a partir de una molaridad inicial de 100 nM, en diluciones en serie de 1:4. En placas de 96 pocillos con fondo en V, se añadieron 5,0x10⁴ PBMC a los pocillos, a los que se añadieron las combinaciones Fab'-X y Fab'-Y tituladas o BYbe titulado. Las combinaciones Fab'-X y Fab'-Y o BYbe se incubaron con las células durante otros 90 minutos. Después de este tiempo, las células B se activaron mediante la adición de 25 µg/ml de IgM anti-humano F(ab')₂ de cabra (Southern Biotechnology) durante 15 horas a 37 °C más CO₂ al 5 %. A continuación se detuvo la reacción de señalización añadiendo un volumen igual de tampón Cytofix (BD Biosciences). Las placas se dejaron luego a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de la centrifugación a 500 xg durante 5 minutos. Se descartó el exceso de sobrenadante del sedimento celular, que se volvió a suspender en el tampón FACS (PBS + 1 % SAB + 0,01 % de NaN₃ + EDTA 2 mM) y se lavó una vez más. A continuación, las células se volvieron a suspender en tampón Perm III enfriado en hielo (BD Biosciences) durante 30 minutos antes de ser lavadas dos veces en tampón de flujo.

- 50 A continuación, las células se tiñeron con un cóctel de anticuerpos anti-CD20 (BD Biosciences) y PLCy2 anti-fosforilada, Akt anti-fosforilada y p38 anti-fosforilada marcados con fluorescencia (BD Biosciences). A continuación, se volvieron a suspender las placas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron otras dos veces y se volvieron a suspender en 20 µl de tampón FACS. La expresión celular de CD20 y fosfo-PLCy2, fosfo-Akt y fosfo-p38 se midieron utilizando un citómetro de flujo Intellicyt iQUE®.

- 55 Utilizando el paquete de software de análisis de datos Forecyt™ (Intellicyt) se identificaron las células B como distintas de otras poblaciones celulares y se calculó la media geométrica de los niveles de PLCy2, Akt y p38 para cada pocillo. A continuación, todos los datos se expresaron como el porcentaje de inhibición de la respuesta máxima (solo anti-IgM) menos el fondo (solo células).

Resultados

- 60 Ensayo PhosFlow: Los datos de la Figura 34 muestran que orientar selectivamente el antígeno 3 y el antígeno 2 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la PLCy2 fosforilada en células B estimuladas con anti-IgM. Los datos de la Figura 35 muestran que orientar selectivamente el antígeno 3 y el antígeno 2 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la P38 fosforilada en células B estimuladas con anti-IgM. Los datos de la Figura 36 muestran que orientar selectivamente el antígeno 3 y el antígeno 2 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la Akt fosforilada en células B estimuladas con anti-IgM.

Ensayo de marcadores de activación: Como puede verse en la Figura 37, los datos muestran que orientar selectivamente el antígeno 3 y el antígeno 2 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la expresión de CD71 en células B estimuladas con anti-IgM. Los datos de la Figura 38 muestran que orientar selectivamente el antígeno 3 y el antígeno 2 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la expresión de CD40 en células B estimuladas con anti-IgM. Los datos de la Figura 39 muestran que orientar selectivamente el antígeno 3 y el antígeno 2 en el formato Fab-Kd-Fab o BYbe puede inhibir la expresión de CD86 en células B estimuladas con anti-IgM

Ejemplo 16 - Comparación de la actividad del antígeno 2 más codireccionalamiento del antígeno 3 en un formato Bybe biespecífico ligado molecularmente con la adición adicional de un dominio de unión anti-albúmina para prolongar la semivida *in vivo*.

Introducción: Comprobar que la actividad del par de dianas identificada en el complejo de cribado enlazado heterodiméricamente Fab-Kd-Fab podría traducirse en una actividad similar deseada en un formato terapéutico alternativo ligado molecularmente con una extensión de la semivida *in vivo* dirigida contra la albúmina, se fusionó un fragmento de anticuerpo anti-albúmina con la cadena ligera del Fab antígeno 3 del formato BYbe descrito en el Ejemplo 15. La especificidad para antígeno 2 (VR4447) y la especificidad para antígeno 3 (VR4130 y VR4126) se generaron en un formato Bybe con y sin adición de un fragmento anti-albúmina (VR0645).

Descripción de las construcciones utilizadas en este experimento.

Nombre de la construcción	Especificidad para Fab	Cadena pesada	Cadena ligera
VR4447/VR4126 BYbe	Antígeno 2	Antígeno 3	Ninguna
VR4447/VR4126/VR645) BYbe/Albúmina	Antígeno 2	Antígeno 3	Albúmina
VR4447/VR4130 BYbe	Antígeno 2	Antígeno 3	Ninguna
VR4447/VR4130/VR645) BYbe/Albúmina	Antígeno 2	Antígeno 3	Albúmina

Métodos

Purificación de BYbes para el cribado funcional:

El formato de BYbe para el cribado funcional (Fab-dsscFv [scFv fuera del extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab]) se purificó de la siguiente manera. Los sobrenadantes de cultivos celulares clarificados de expresión estándar expiHEK o CHO se filtraron de forma estéril con un tamaño de 0,22 µm. Los sobrenadantes filtrados se cargaron a 2 ml/min en columnas GammabindPlus Sefarosa XK26 de 50 ml (GE Healthcare) equilibradas en PBS pH 7,4 (Sigma Aldrich Chemicals). Tras la carga, las columnas se lavaron con PBS pH 7,4 y luego se eluyeron con Glicina/HCl 0,1 M, pH 2,7. La elución fue seguida por la absorbencia a 280 nm, el pico de elución se recogió, y luego se neutralizó con 1/25 de volumen de Tris/HCl 2 M pH 8,5. Las muestras neutralizadas se concentraron utilizando concentradores Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa o 30 kDa y centrifugación a 4000 xg en un rotor oscilante. Las muestras concentradas se aplicaron a una columna XK16/60 o XK26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en PBS, pH 7,4. Las columnas se desarrollaron con un gradiente isocrático de PBS, pH 7,4 a 1 ml/min o 2,6 ml/min, respectivamente. Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5 µm, 7,8 X 300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm. Las fracciones monoméricas seleccionadas se agruparon y concentraron a >1 mg/ml utilizando un concentrador Amicon Ultra-15 con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa o 30 kDa y centrifugación a 4000 xg en un rotor oscilante. Las muestras finales se analizaron; para concentración mediante el espectrofotómetro UV-visible de barrido A280 (Cary 50Bio); para el % de monómeros mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna TSK gel G3000SWXL; 5 µm, 7,8x300 mm desarrollada con un gradiente isocrático de fosfato 0,2 M, pH 7,0 a 1 ml/min, con detección por absorbancia a 280 nm; mediante análisis SDS-PAGE reductor y no reductor en geles de 1,5 mm de Tris-Glicina al 4-20 % (Novex) a 50 mA (por gel) durante 53 minutos; y para la endotoxina mediante el sistema de prueba portátil EndoSafe® de Charles River con cartuchos de prueba de lisado de amebocitos de limulus (LAL).

Se preincubaron 100 nM de cada proteína purificada de la construcción con PBMC humanas derivadas de cinco donantes distintos durante 60 minutos a 37 grados C/CO₂ al 5 % en medio RPMI 1640 más suero bovino fetal al 10 % y Glutamax 2 mM (medio R10). Después de 60 minutos, se estimularon las células con 25 µg/ml de un anticuerpo anti-IgM de cabra diseñado para estimular únicamente las células B. 24 horas después, las placas se colocaron en hielo para detener cualquier otra activación celular antes de lavarlas una vez con tampón de citometría de flujo frío (PBS+ASB al 1 % +0,01 % NaN₃). Se eliminó todo el sobrenadante y se volvieron a suspender los sedimentos celulares. Las células se colocaron en hielo y se añadió un cóctel de anticuerpos anti-CD19, -CD20, -CD27, -CD71 y CD86. Las células se incubaron durante 60 minutos antes de lavarlas dos veces en tampón de citometría de flujo. Se generaron datos sobre la unión de anti-CD27, -CD71 y CD86 a las células B CD19/CD20 positivas utilizando un citómetro de flujo

de alto rendimiento iQUE. Se utilizó el software Forecyt para generar histogramas y derivar lecturas de intensidad media geométrica para la unión de los anticuerpos anti-CD27, -CD71 y CD86 a las células B. Estos datos se importaron a Excel y se generaron valores porcentuales de inhibición para cada combinación. A continuación, los datos se importaron a Graphpad Prism y se generaron gráficos de caja y bigotes para cada combinación con la media indicada por un "+".

La Figura 40 muestra la inhibición de la expresión de CD27 en células B inducida por VR4447/VR4126 Bye y VR4447/VR4126/VR645 BYbe/Albúmina. En los cinco donantes analizados, se mostraron niveles constantemente similares de inhibición de CD27 inducida por anti-IgM. La Figura 41 muestra la inhibición de la expresión de CD71 en células B inducida por VR4447/VR4126 Bye y VR4447/VR4126/VR645 BYbe/Albúmina. En los cinco donantes analizados, se mostraron niveles constantemente similares de inhibición de CD71 inducida por anti-IgM. La Figura 42 muestra la inhibición de la expresión de CD86 en células B inducida por VR4447/VR4126 Bye y VR4447/VR4126/VR645 BYbe/Albúmina. En los cinco donantes analizados, se mostraron niveles constantemente similares de inhibición de CD86 inducida por anti-IgM.

Secuencias de GCN4(7P14P)

ASGGGRMKQLEPKVEELLPKNYHLENEVARLKKLVGERHHHHHH SEQ ID NO: 1 en donde los aminoácidos en negrita son opcionales y los aminoácidos en cursiva son la secuencia enlazadora

GCTAGCGGAGGCGGAAGAATGAAACAACCTTGAACCCAAGGTTGAAGAATTGCTTCCGAAAAA
TTATCACTTGGAAAATGAGGTTGCCAGATTAAAGAAATTAGTTGGCGAACGCCATCACCATC
ACCATCAC SEQ ID NO: 2

Secuencia de ds scFv 52SR4

DAVVTQESALTSSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYASWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGV
PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCVLWYSDHWVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSDVQLQQSGPGLVAPSQSLITCTVSGFLLTDYGVNWVRQSPGKCLEWLG
IWDGITDYNALKSRLSVTKDNSKSQVFLKMNSLQSGDSARYYCVTGLFDYWGQGTTLT
VSSAAAHHHHHHEQKLISEEDL- SEQ ID NO: 3

GATGCGGTGGTGACCCAGGAAAGCGCGCTGACCAGCAGCCCGGGCGAAACCGTGACCCTGAC
CTGCCGCAGCAGCACCGGCGCGGTGACCACCAGCAACTATGCGAGCTGGGTGCAGGAAAAAC
CGGATCATCTGTTTACCGGCCTGATTGGCGGCACCAACAACCGCGCGCCGGGCGTGCCGGCG
CGCTTTAGCGGCAGCCTGATTGGCGATAAAGCGGCGCTGACCATTACCGGCGCGCAGACCGA
AGATGAAGCGATTTATTTTTCGTGCTGTGGTATAGCGACCATTGGGTGTTTGGCTGCGGCA
CCAAACTGACCGTGCTGGGTGGAGGCGGTGGCTCAGGCGGAGGTGGCTCAGGCGGTGGCGGG
TCTGGCGGCGGCGGCAGCGATGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGGCGCCGAG
CCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTCTCCTGACCGATTATGGCGTGAAC
GGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAATGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGGGCGATGGCATT
ACCGATTATAACAGCGCGCTGAAAAGCCGCTGAGCGTGACCAAAGATAACAGCAAAAGCCA
GGTGTCTTCTGAAAATGAACAGCCTGCAGAGCGGCGATAGCGCGCGCTATTATTGCGTGACCG
GCCTGTTTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGACCGTGAGCAGCGCGGCCCGCCATCAC
CATCACCATCACGAACAGAACTGATTAGCGAAGAAGATCTGTAATAG
SEQ ID NO: 4

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCB Pharma

<120> Nuevo formato biespecífico adecuado para su uso en el cribado de alto rendimiento

<130> G0221_WO01

<160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de GCN4 (7P14P)

<400> 1

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

Leu Leu Pro Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys
20 25 30

Lys Leu Val Gly Glu Arg His His His His His His
35 40

<210> 2

<211> 132

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica la SEQ ID NO: 1

<400> 2

gctagcggag gcggaagaat gaaacaactt gaaccaagg ttgaagaatt gcttccgaaa 60
aattatcact tggaaaatga ggttgccaga ttaaagaaat tagttggcga acgccatcac 120
catcaccatc ac 132

<210> 3

<211> 262

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ds scFv 52SR4

<400> 3

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

ES 2 885 815 T3

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

ES 2 885 815 T3

5	<210> 4 <211> 792 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> ADN que codifica la SEQ ID NO: 3	
10	<400> 4	
	gatgcggtgg tgaccagga aagcgcgctg accagcagcc cgggcgaaac cgtgaccctg 60 acctgccgca gcagcaccgg cgcggtgacc accagcaact atgcgagctg ggtgcaggaa 120 aaaccggatc atctgtttac cggcctgatt ggcggcacca acaaccgcgc gccgggcgtg 180 ccggcgcgct ttagcggcag cctgattggc gataaagcgg cgctgaccat taccggcgcg 240 cagaccgaag atgaagcgat ttatTTTTgc gtgctgtggt atagcgacca ttgggtgttt 300 ggctgcggca ccaaactgac cgtgctgggt ggaggcgggt gctcaggcgg aggtggctca 360 ggcgggtggcg ggtctggcgg cggcggcagc gatgtgcagc tgcagcagag cggcccgggc 420 ctggtggcgc cgagccagag cctgagcatt acctgcaccg tgagcggctt tctcctgacc 480 gattatggcg tgaactgggt gcgccagagc ccgggcaaata gcctggaatg gctgggcgtg 540 atTTggggcg atggcattac cgattataac agcgcgctga aaagccgcct gagcgtgacc 600 aaagataaca gcaaaagcca ggtgtttctg aaaatgaaca gcctgcagag cggcgatagc 660 gcgcgctatt attgcgtgac cggcctgttt gattattggg gccagggcac caccctgacc 720 gtgagcagcg cggccgccc taccatcac catcacgaac agaaactgat tagcgaagaa 780 gatctgtaat ag 792	
15	<210> 5 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE <400> 5	
25	Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala 1 5	
30	<210> 6 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE <400> 6	
35		

ES 2 885 815 T3

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

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE

<400> 7

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

Pro Ala

<210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE

<400> 8

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

Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
20 25

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE

<400> 9

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

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

<210> 10
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE

<400> 10

ES 2 885 815 T3

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

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

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE

<400> 11

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

<210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE

<400> 12

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

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

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ENLAZADOR PEPTÍDICO FLEXIBLE

<400> 13

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

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 14

ES 2 885 815 T3

		Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu 1 5
5	<210> 15 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Enlazador flexible <400> 15	
		Asp Lys Thr His Thr Ser 1 5
15	<210> 16 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Enlazador flexible <400> 16	
25		Ser Gly Gly Gly Gly Ser 1 5
30	<210> 17 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Enlazador flexible	
35	<400> 17	
		Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser 1 5 10
40	<210> 18 <211> 16 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Enlazador flexible <400> 18	
50		Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 1 5 10 15
55	<210> 19 <211> 21 <212> PRT <213> Secuencia artificial	

ES 2 885 815 T3

<220>

<223> Enlazador flexible

<400> 19

5

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

Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 20

<211> 26

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador flexible

15

<400> 20

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

20

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Enlazador flexible

<400> 21

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

30

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador flexible

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45

<400> 22

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

<210> 23

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Enlazador flexible

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<400> 23

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

Gly	Ala	Ser	Ala	Ser
			20	

20

<210> 24
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Enlazador flexible

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40

<400> 24

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

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

<210> 25
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Enlazador flexible

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 25

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

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

25 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador flexible

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 26
 40

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

<210> 27
 <211> 28
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador flexible
 50

<400> 27

ES 2 885 815 T3

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

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

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 28

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 29

Ala Thr Thr Thr Gly Ser
1 5

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 31

ES 2 885 815 T3

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

Ser His Lys Ser Pro
20

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 32

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

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 33

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

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Lys Val Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 35

Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Ser His Asp Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 36
<211> 15
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador flexible

5

<400> 36

Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Leu	Ile	Thr	Ile	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

10

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Enlazador flexible

<400> 37

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

20

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador flexible

30

<400> 38

Gly	Gly	Glu	Lys	Ser	Ile	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10		

35

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Enlazador flexible

<400> 39

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

Arg Pro

45

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Enlazador flexible

<400> 40

ES 2 885 815 T3

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

Thr Thr

5 <210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Enlazador flexible

<400> 41

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

Phe Asn

15 <210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Enlazador flexible

<400> 42

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

Pro Ala

30 <210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Enlazador flexible

<400> 43

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

Arg Thr

40 <210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Enlazador flexible

<400> 44

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

Phe Gly

5

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador flexible

15 <400> 45

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

Gly Ala

<210> 46

20 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Enlazador flexible

<400> 46

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

Asp Leu

30

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Enlazador flexible

<400> 47

40

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

Ser Leu

<210> 48

<211> 18

ES 2 885 815 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 48

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

Ile Ser

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 49

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

Pro

<210> 50
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 50

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

Pro Pro

<210> 51
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador flexible

<400> 51

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

Pro Tyr

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador flexible

 10 <400> 52

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

 Pro

 15 <210> 53
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Enlazador flexible

 <400> 53

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

 Leu Arg

 25 <210> 54
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Enlazador flexible

 <400> 54

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

 Phe Pro

 40 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 45 <400> 55

 Asp Leu Cys Leu Arg Asp Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10

ES 2 885 815 T3

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 10 <400> 56

 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10

 <210> 57
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Enlazador

 <400> 57

 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Gly Asp
 1 5 10 15
 25
 <210> 58
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador

 <400> 58
 35
 Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

 Glu Asp Asp Glu
 20

 <210> 59
 <211> 20
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador
 45
 <400> 59

 Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10 15

 Gly Arg Ser Val
 20

 50 <210> 60
 <211> 21

ES 2 885 815 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 60

Gln Gly Leu Ile Gly Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Gly Arg Ser Val Lys
20

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 61

Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
1 5 10 15

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 62

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

Asp Asp

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 63

Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp
1 5 10 15

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador

<400> 64

5 Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp
1 5 10 15

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador

15 <400> 65

Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Ala Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

Asp Asp

<210> 66

20 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Enlazador

<400> 66

Glu Val Arg Ser Phe Cys Thr Arg Trp Pro Ala Glu Lys Ser Cys Lys
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly
20

30 <210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Enlazador

<400> 67

40 <210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

Arg Ala Pro Glu Ser Phe Val Cys Tyr Trp Glu Thr Ile Cys Phe Glu
1 5 10 15

Arg Ser Glu Gln
20

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 885 815 T3

<223> Enlazador

<400> 68

Glu Met Cys Tyr Phe Pro Gly Ile Cys Trp Met

5 1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica

15 <400> 69

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

<210> 70

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia peptídica

<400> 70

Pro Pro Pro Pro
1

30 <210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Enlazador

40 <400> 71

Ala Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 72

<211> 8

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador

50 <400> 72

ES 2 885 815 T3

Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5			

REIVINDICACIONES

1. Un complejo proteico biespecífico que tiene la fórmula A-X:Y-B, en donde:

- 5 A-X es una primera proteína de fusión;
 Y-B es una segunda proteína de fusión;
 X:Y es un enlace heterodimérico;
 : es una interacción de unión entre X e Y;
 A es un primer componente proteico del complejo proteico biespecífico seleccionado de un fragmento Fab o Fab';
 10 B es un segundo componente proteico del complejo proteico biespecífico seleccionado de un fragmento Fab o Fab';
 en donde X se selecciona independientemente de scFv, o un péptido, con la condición de que, cuando X es un péptido, Y es un scFv y, cuando X es un scFv, entonces Y es un péptido;
 en donde X o Y es un scFv específico para el péptido GCN4 representado por la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos
 15 1 a 38 de la SEQ ID NO:1; en donde el scFv se designa 52SR4 y está representado por la SEQ ID NO:3 o los aminoácidos 1 a 243 de la SEQ ID NO:3 y en donde X o Y es un péptido GCN4 representado por la SEQ ID NO:1 o los aminoácidos 1 a 38 de la SEQ ID NO:1.

20 2. El complejo proteico biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde A es un fragmento Fab; y/o B es un fragmento Fab.

 3. Una complejo proteico biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde X y/o Y se fusiona, opcionalmente a través de un enlazador, con el extremo C-terminal de la cadena pesada en el fragmento Fab o Fab'.

25 4. Un complejo proteico biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde A y/o B es específico para un antígeno seleccionado del grupo que comprende: receptores de superficie celular, tales como los receptores de señalización de células T o células B, moléculas coestimuladoras, inhibidores del punto de control, receptores de linfocitos citolíticos naturales, receptores de inmunoglobulinas, familia de receptores de TNFR, receptores de la familia B7, moléculas de adhesión, integrinas, receptores de citocinas/quimiocinas, GPCRs, receptores del factor de crecimiento, receptores de quinasas, antígenos específicos de tejidos, antígenos cancerosos, receptores de reconocimiento de patógenos, receptores del complemento, receptores hormonales, o moléculas solubles tales como citocinas, quimiocinas, leucotrienos, factores de crecimiento, hormonas, enzimas y canales iónicos.

35 5. Una composición que comprende uno o más complejos proteicos biespecíficos definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

40 6. El complejo proteico biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en terapia.

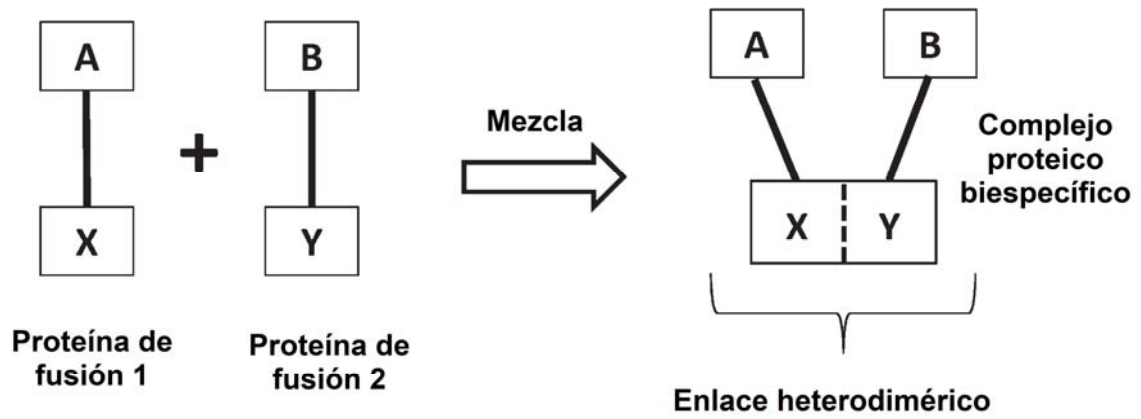


Figura 2

	A_1X	A_2X	A_3X	A_4X
B_1Y	$A_1X B_1Y$	$A_2X B_1Y$	$A_3X B_1Y$	$A_4X B_1Y$
B_2Y	$A_1X B_2Y$	$A_2X B_2Y$	$A_3X B_2Y$	$A_4X B_2Y$
B_3Y	$A_1X B_3Y$	$A_2X B_3Y$	$A_3X B_3Y$	$A_4X B_3Y$
B_4Y	$A_1X B_4Y$	$A_2X B_4Y$	$A_3X B_4Y$	$A_4X B_4Y$

Figura 3

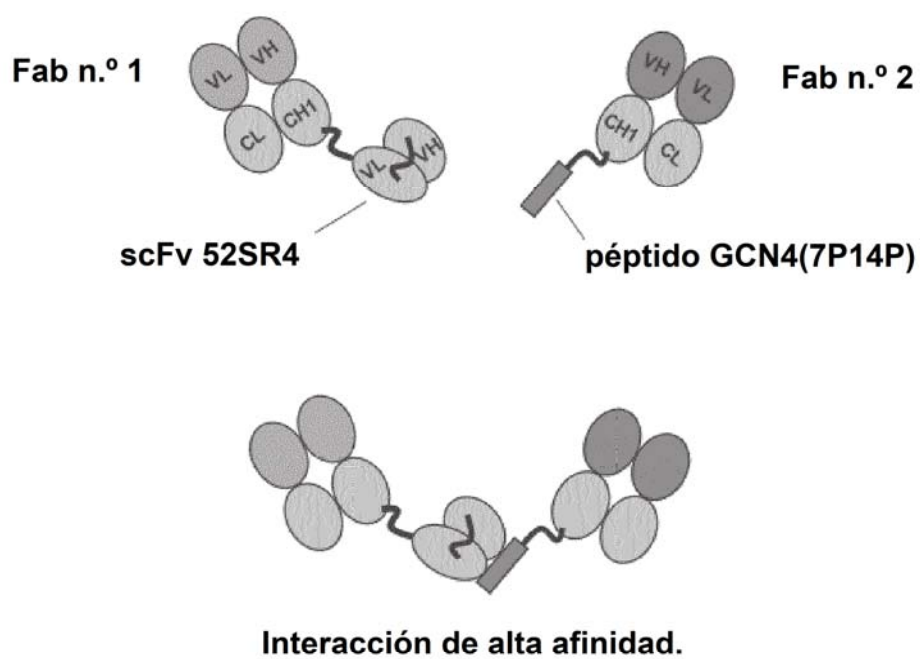


Figura 4

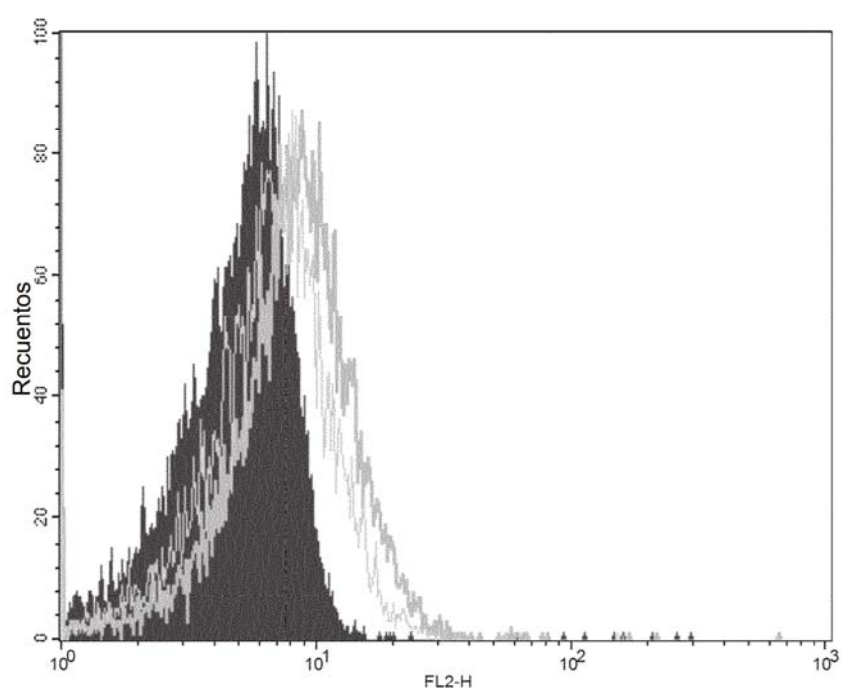


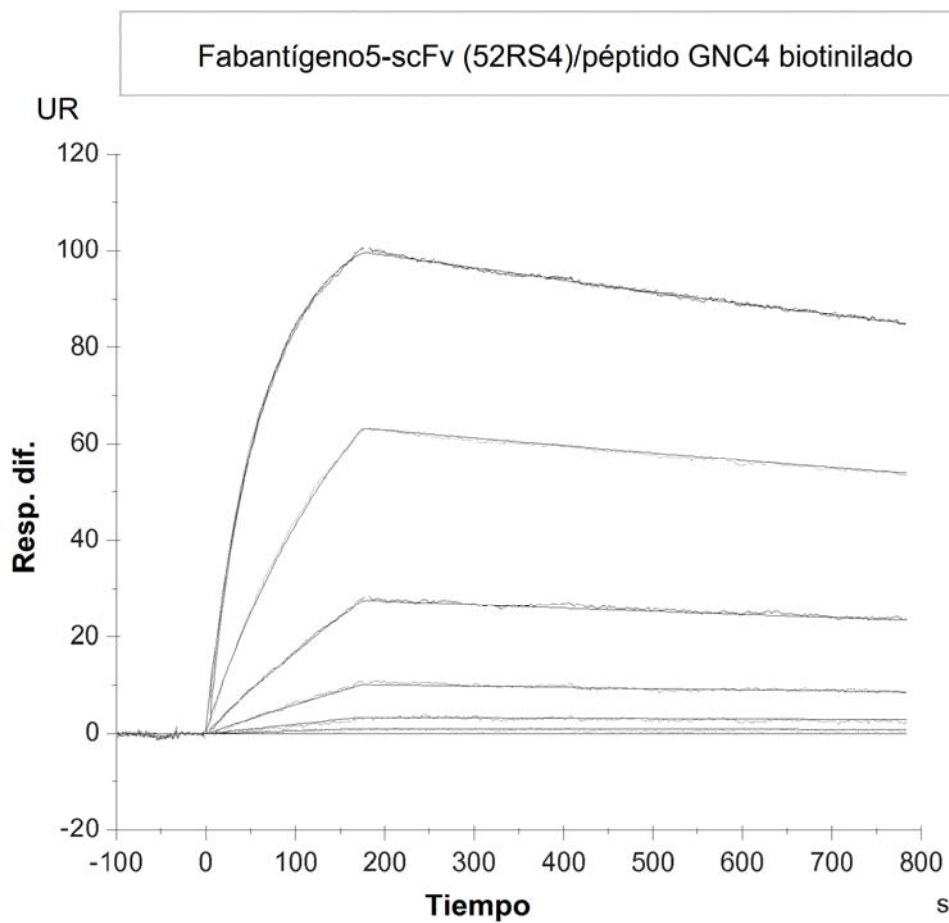
Figura 5

Figura 6

Análisis de resonancia de plasmón superficial de la unión de Fabantígeno 5-scFv al péptido GNC4

Muestra	Biotina-péptido GNC4			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Afinidad (pM)	% de inmunorreactividad
Fabantígeno5scFv52RS4	5.10E+05	2.70E-04	516	105

% de inmunorreactividad = $R_{\text{máx}}/R_{\text{máx estimada}} \times 100$



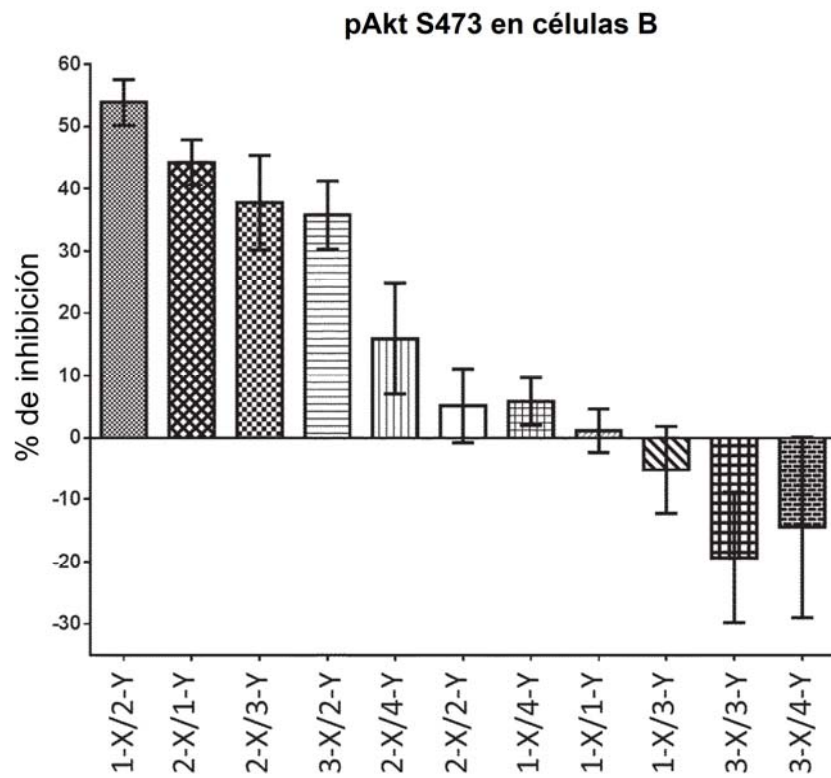


Figura 7

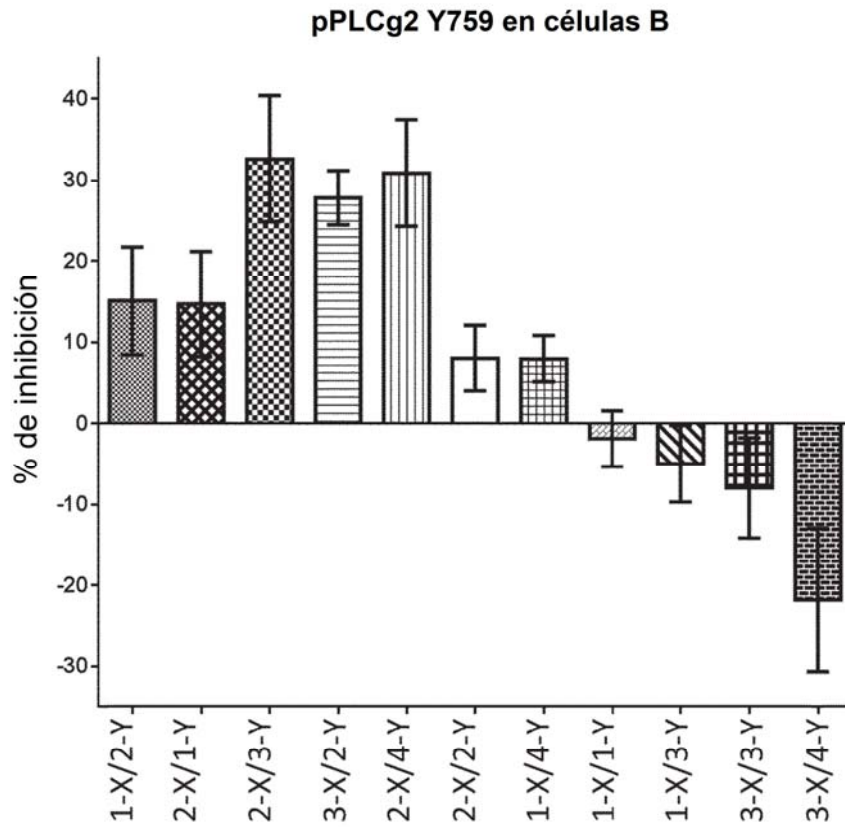


Figura 8

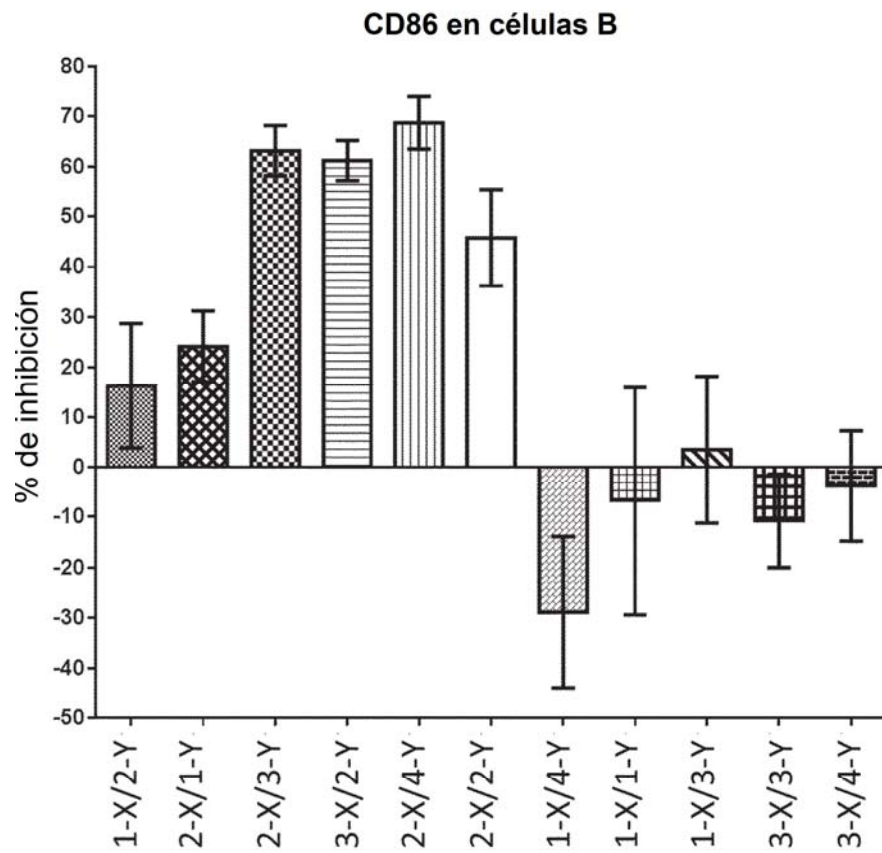


Figura 9

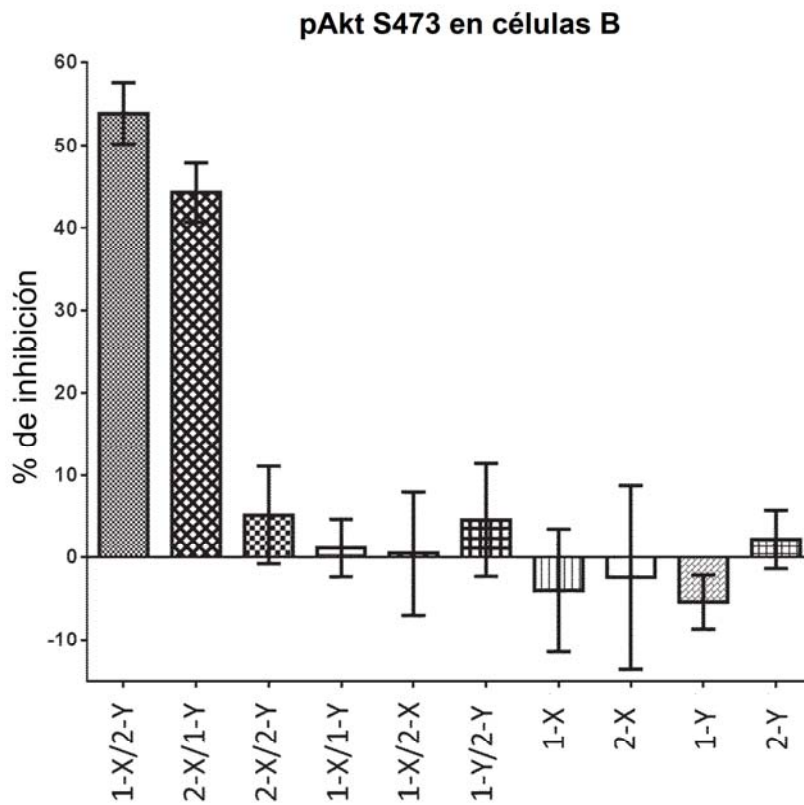


Figura 10

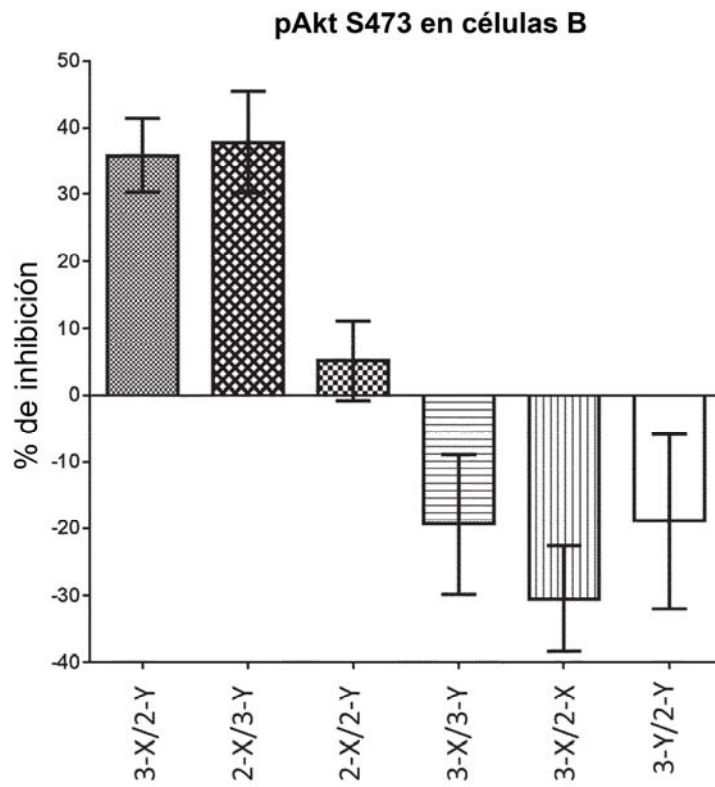


Figura 11

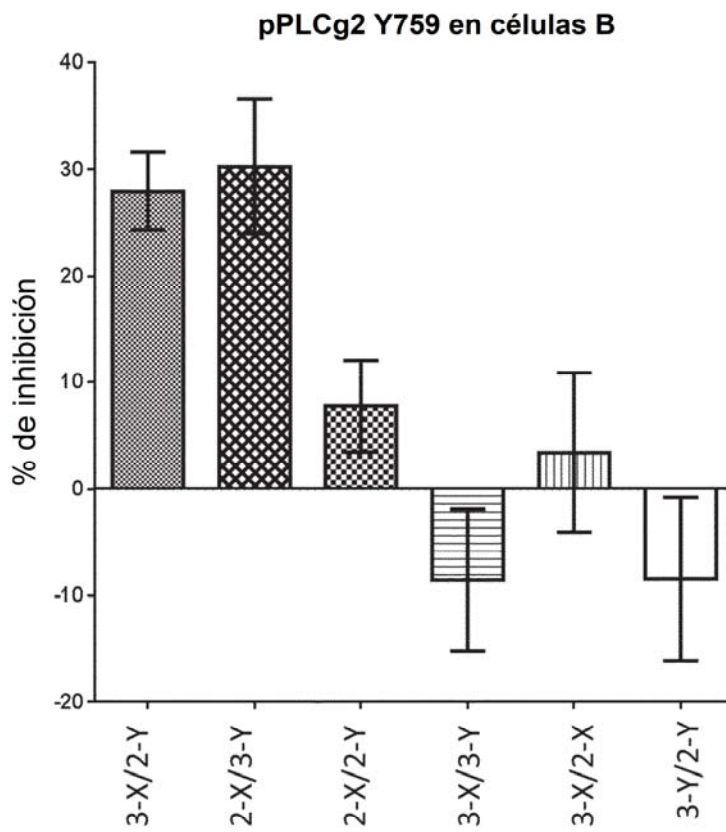


Figura 12

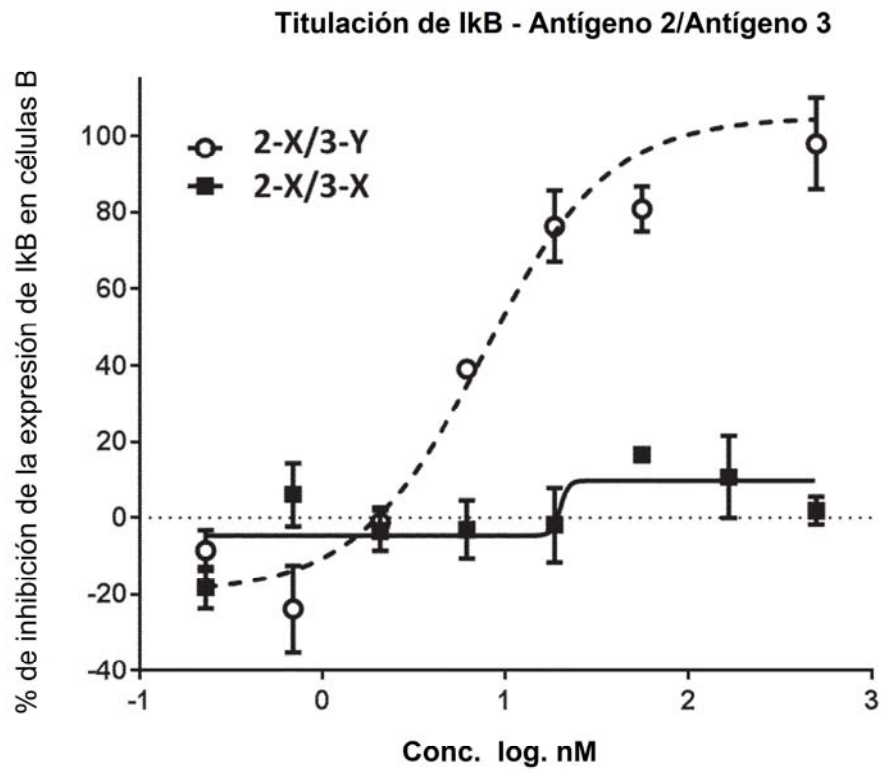


Figura 13

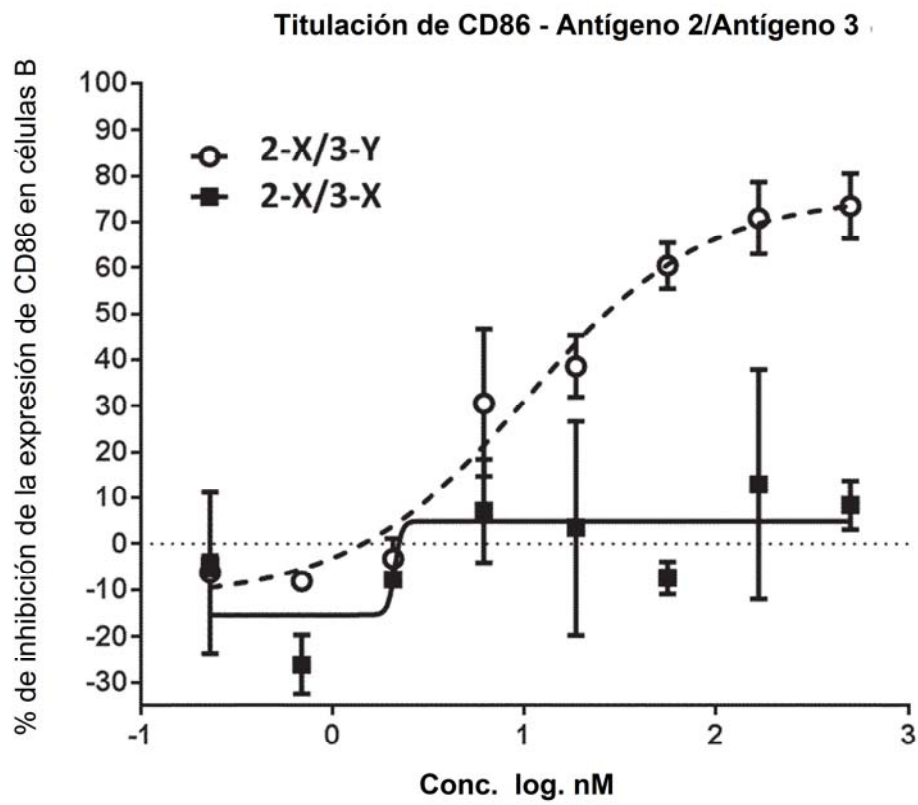


Figura 14

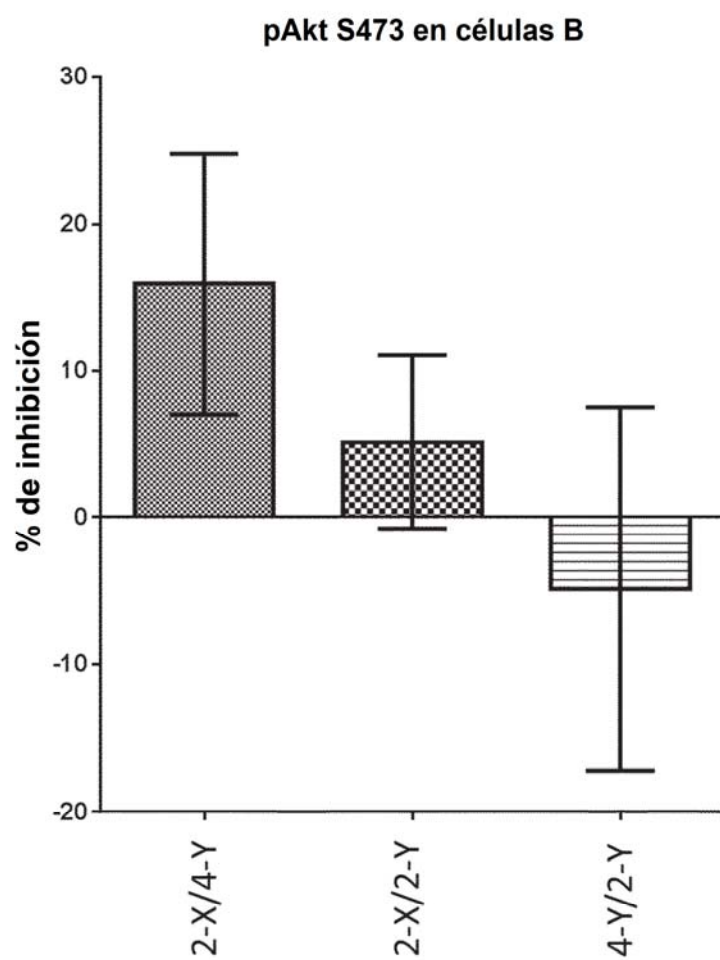


Figura 15

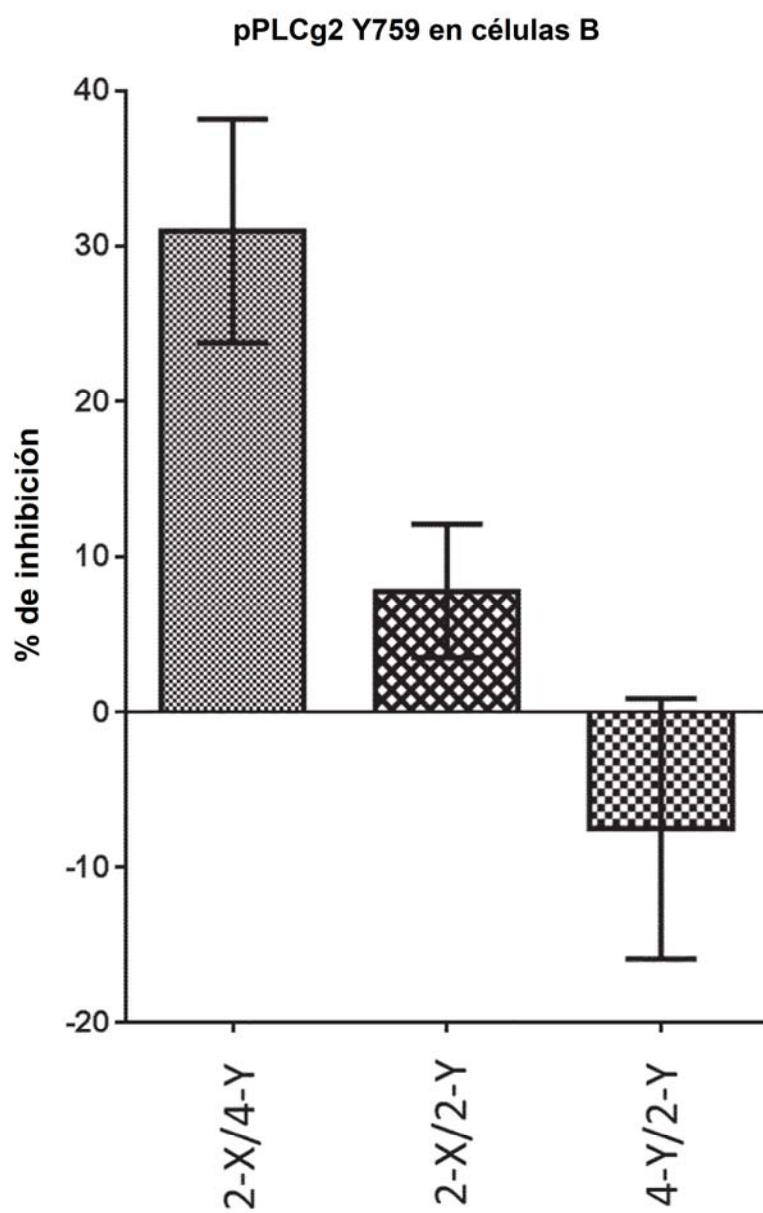
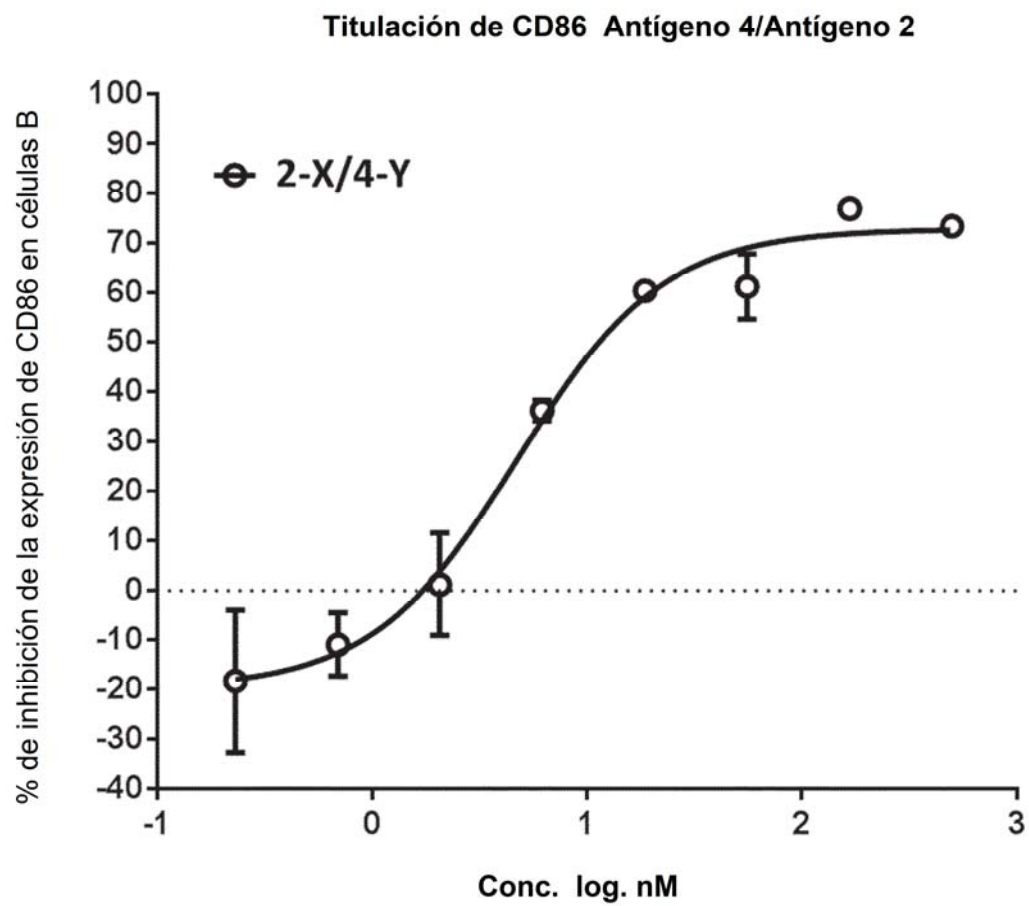


Figura 16

**Figura 17**

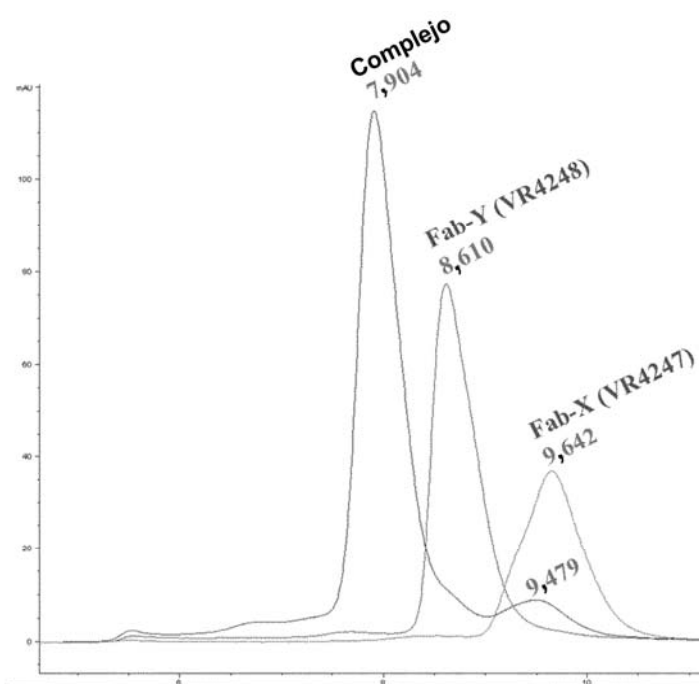


Figura 18

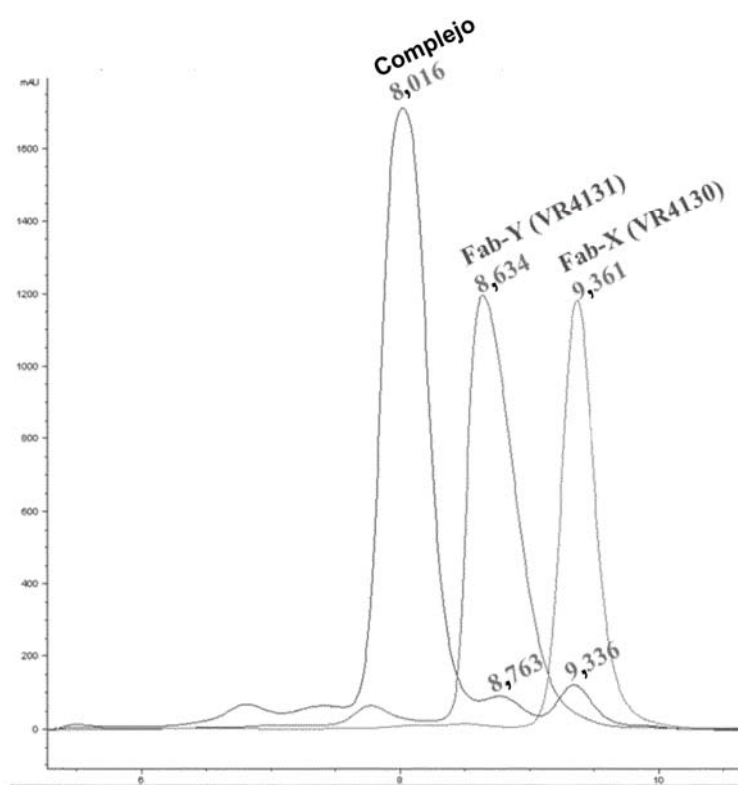


Figura 19

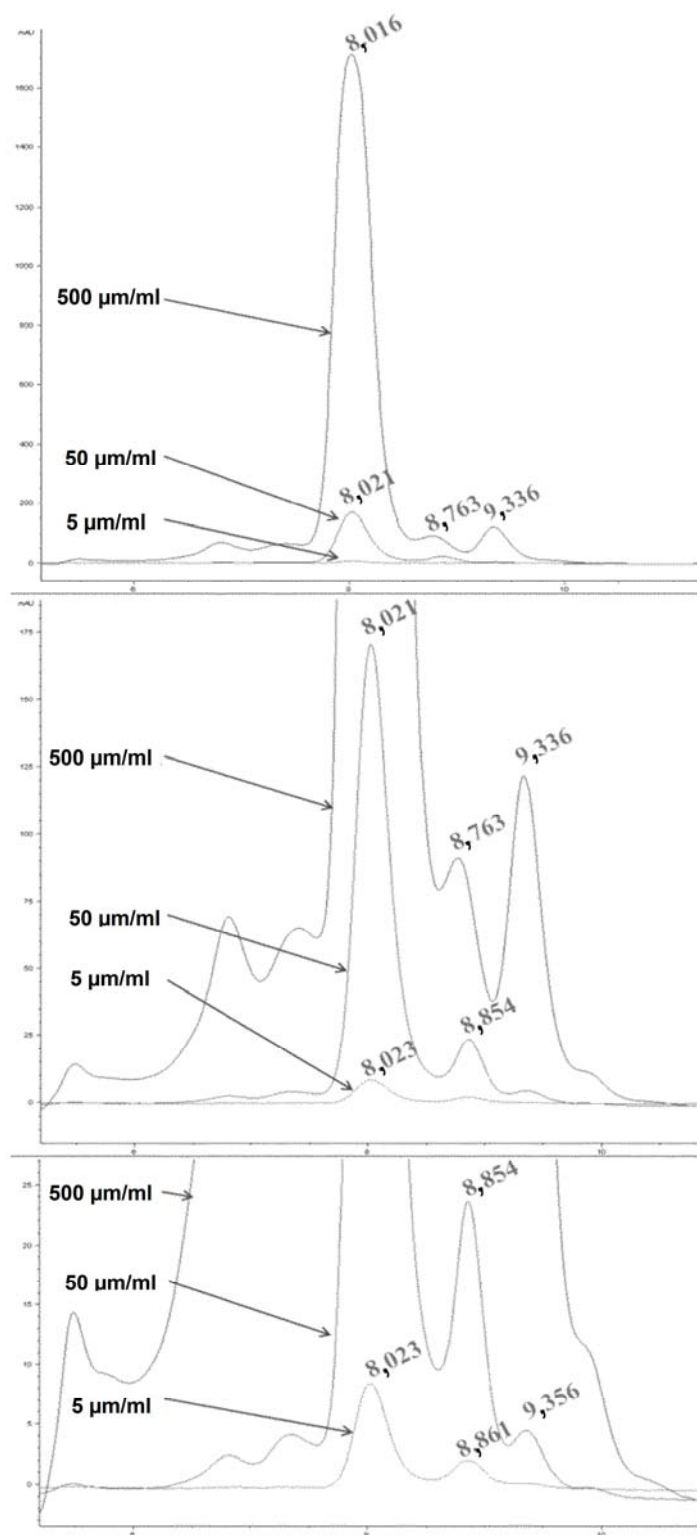


Figura 20

Especificidad de Fab-X para antígeno 1 -

SP_Y...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-4,37	33,57	10,45	13,99	3,81	4,26	8,34	21,07	4,10	13,98	6,07	16,03	7,39	9,00	23,01
2	27,22	25,26	52,32	63,81	30,98	19,94	26,90	29,48	20,58	30,61	9,05	4,18	14,73	36,56	33,04
3	17,62	69,66	3,88	16,35	7,81	-5,45	6,94	12,43	6,90	7,41	15,55	18,23	8,31	7,13	15,98
4	13,81	70,47	-9,21	11,98	2,91	-0,27	7,92	9,85	0,93	4,02	8,95	40,06	10,33	6,02	15,96
5	5,05	36,09	-1,78	-0,25	10,55	-14,55	11,68	6,91	-0,32	-2,82	9,14	12,00	3,48	7,99	9,03
6	---	21,62	7,24	15,78	16,88	2,69	2,50	14,67	9,48	4,44	11,14	20,93	12,37	---	---
7	10,54	35,72	2,40	16,16	14,92	1,39	2,23	14,14	5,64	10,62	8,02	17,58	9,49	10,65	10,80
8	6,03	26,05	-7,89	3,46	7,85	-18,33	0,26	-5,98	-2,08	0,09	7,83	5,13	2,60	9,59	9,47
9	13,56	32,14	-4,74	2,87	9,63	-7,13	5,17	10,72	0,79	1,69	9,22	13,53	2,49	15,70	10,52
10	15,35	54,98	13,21	17,70	-2,07	6,11	21,65	23,25	9,94	10,33	16,30	41,50	13,23	6,52	16,72
11	---	-0,28	-50,76	-5,43	-0,23	-118,10	-4,78	-9,59	0,08	-4,95	6,09	2,91	-9,06	---	---
12	5,85	8,47	19,70	42,01	20,13	12,42	15,14	26,89	20,69	24,69	18,86	36,32	18,07	20,28	38,97
13	---	31,56	22,19	28,34	15,50	13,12	14,23	27,59	22,46	14,25	16,00	26,84	16,21	---	---
14	9,13	40,70	10,80	14,56	5,88	8,89	7,52	22,68	6,27	9,04	7,34	33,39	11,20	7,01	14,84
15	9,38	33,18	7,13	11,20	15,92	11,35	9,90	19,61	9,90	10,62	13,98	28,99	15,26	13,77	25,64
16	---	26,46	-7,59	19,38	15,65	-24,93	12,05	14,00	15,27	11,98	13,29	20,57	11,99	---	---
17	---	22,79	-4,70	19,07	17,98	-37,56	10,99	11,71	15,83	8,61	10,98	21,28	9,71	---	---
18	---	28,91	29,09	33,25	23,16	10,61	13,85	26,28	21,37	18,39	18,45	32,78	18,27	---	---
19	---	33,63	-15,93	2,00	15,54	-24,55	11,73	10,55	7,32	4,45	15,19	20,98	10,61	---	---
20	---	24,94	-13,88	20,88	10,53	-21,56	8,43	6,69	8,81	7,57	10,73	17,52	13,55	---	---
21	---	23,94	6,69	22,70	22,45	-3,18	13,33	21,28	15,88	10,81	15,92	25,96	17,22	---	---
22	13,93	20,55	-18,75	-4,96	6,90	-17,32	4,12	-3,15	-4,19	-6,48	11,71	2,48	-0,84	9,14	11,68
23	---	24,25	-9,45	22,83	24,63	-26,70	9,65	13,79	10,74	7,96	13,02	24,43	18,33	---	---

% de inhibición de Syk

Figura 21

Figura 22

Especificidad de Fab-X para antígeno 1 -15

SP_Y...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0,81	22,29	11,45	10,78	5,39	1,60	7,43	5,90	2,24	3,29	-2,71	10,80	0,99	6,90	-4,08
2	19,70	18,61	44,00	50,83	23,17	19,01	24,57	21,47	25,89	39,80	12,35	0,52	18,91	28,55	25,89
3	17,93	61,18	3,00	15,38	5,38	-0,12	4,05	3,77	6,84	12,78	11,01	16,71	2,97	9,17	4,69
4	13,34	55,83	-3,82	7,24	1,41	-1,39	6,75	0,89	3,12	3,12	4,16	40,49	1,71	5,13	1,10
5	0,34	25,16	0,51	-0,63	7,36	-1,41	11,49	4,08	5,59	2,99	5,76	11,67	2,84	5,90	-2,06
6	---	20,71	-0,85	6,04	0,40	3,49	-2,60	-0,87	3,41	0,22	1,34	12,34	3,36	---	---
7	10,95	27,95	1,38	15,66	11,27	2,40	2,48	4,45	6,13	16,07	3,18	12,77	3,92	5,85	0,37
8	7,73	24,86	4,02	5,23	3,56	0,49	2,68	-1,16	2,39	1,45	4,10	8,50	-0,64	3,01	0,97
9	7,37	28,27	-0,02	3,22	6,39	1,35	4,75	4,06	4,92	4,09	3,10	10,50	0,62	5,62	1,50
10	17,08	47,69	7,72	5,65	-5,55	1,40	21,89	6,66	5,90	5,11	7,61	35,77	1,50	4,32	-0,06
11	---	11,76	-10,93	1,38	-0,56	-24,94	-1,36	0,83	3,58	3,88	5,92	11,18	-4,57	---	---
12	6,05	-3,88	9,02	29,48	4,92	1,15	1,89	5,75	7,23	20,95	5,44	17,92	3,37	16,34	8,67
13	---	23,78	-0,99	7,30	0,43	-1,40	1,83	6,41	8,91	3,25	2,76	11,64	5,41	---	---
14	4,40	28,11	1,77	5,61	4,01	1,73	5,95	2,45	4,05	6,85	-0,60	20,60	5,45	4,11	0,05
15	4,96	25,60	0,87	3,43	5,41	1,77	1,89	1,80	3,72	1,96	2,29	14,57	5,26	2,36	0,11
16	---	22,39	-5,77	4,50	2,41	-6,86	4,89	2,52	5,19	3,07	3,38	9,47	1,17	---	---
17	---	19,53	-6,98	6,73	2,99	-10,27	2,35	2,13	6,02	2,08	3,10	10,86	2,03	---	---
18	---	19,90	2,43	12,38	2,08	-1,05	1,09	4,25	6,70	4,90	4,40	12,49	4,34	---	---
19	---	35,50	-12,22	-2,38	-1,61	-9,05	5,97	1,78	5,27	4,63	5,92	15,60	3,16	---	---
20	---	21,53	-9,67	2,95	-0,16	-6,71	-3,46	-4,81	4,13	2,31	6,52	10,96	4,25	---	---
21	---	19,03	-6,66	2,36	1,10	-6,49	-0,95	5,09	4,96	3,55	3,97	10,89	3,63	---	---
22	14,73	26,47	-5,00	0,58	3,97	-0,08	3,70	-1,25	1,72	0,99	11,40	7,99	2,80	8,39	4,58
23	---	19,72	-16,22	0,75	-1,16	-11,03	-3,57	3,30	3,57	1,23	4,90	8,22	4,20	---	---

% de inhibición

Especificidad de Fab-Y para antígeno 1 -23

Figura 23

Especificidad de Fab-X para antígeno 1 -15

SP_Y...	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-11,06	53,06	-1,56	6,02	-8,08	-12,41	3,84	-12,93	-8,22	-8,88	-11,49	-3,34	-17,29	-4,43	-6,28
2	40,41	37,15	48,29	48,35	39,50	30,66	40,36	25,61	42,23	42,64	32,59	37,11	26,58	35,70	38,11
3	13,19	70,81	2,37	15,53	8,68	7,93	12,32	3,78	10,56	14,18	8,76	-1,58	6,61	10,75	10,83
4	8,35	55,50	-6,07	17,80	7,97	7,14	8,49	6,54	6,98	9,67	12,96	41,04	5,99	9,28	7,89
5	-3,80	40,21	-0,85	13,54	2,05	-2,13	3,01	-6,86	0,91	2,02	0,76	4,48	-3,42	4,06	0,15
6	---	40,39	6,67	19,26	-4,86	12,95	3,52	2,59	6,73	5,65	5,28	4,77	-1,03	---	---
7	0,53	45,36	4,87	18,76	4,08	0,72	-1,43	5,07	4,69	11,49	6,48	5,72	4,78	0,73	-3,71
8	6,61	37,54	5,72	16,25	-1,45	2,38	0,64	0,17	1,10	2,08	6,50	7,58	2,18	-4,37	-4,53
9	0,51	42,34	0,95	9,41	-0,30	1,07	2,86	-2,56	0,51	-0,55	2,07	2,49	-2,84	4,54	0,16
10	11,13	52,32	3,75	12,67	-4,41	3,82	15,78	-3,15	5,70	4,26	1,77	22,73	-4,68	7,65	8,05
11	---	33,40	-3,95	18,04	7,48	6,00	3,13	4,24	5,66	13,11	9,85	11,24	2,04	---	---
12	0,69	29,50	-7,93	38,94	2,68	4,95	-0,13	-2,53	2,52	15,03	-0,82	3,63	-5,61	25,99	12,57
13	---	35,33	-4,80	10,35	-4,98	-7,45	-7,91	-6,47	3,78	-0,83	-4,68	-3,84	-9,54	---	---
14	1,62	44,02	0,91	16,05	1,80	-2,56	1,09	-4,49	3,94	5,30	-0,19	8,15	-5,85	5,21	0,66
15	2,25	36,02	-2,44	10,00	-0,22	0,37	-2,20	-2,11	2,41	1,84	3,23	2,78	2,51	-2,19	-4,62
16	---	33,56	-3,12	15,33	0,19	-5,46	-0,71	-5,67	1,83	1,35	-0,24	-1,99	-8,53	---	---
17	---	35,02	-4,92	16,87	1,78	-2,20	0,34	-2,12	3,07	1,17	0,98	0,80	-2,14	---	---
18	---	31,31	-1,77	19,71	-6,19	-4,39	-3,72	-3,91	2,70	3,44	-0,42	-1,65	-5,72	---	---
19	---	50,00	-2,93	9,92	2,01	9,54	10,19	2,60	11,44	9,94	7,96	9,17	3,37	---	---
20	---	38,56	-1,83	18,96	1,40	5,57	0,37	1,23	4,23	6,85	10,48	6,54	2,60	---	---
21	---	36,74	1,67	11,59	-5,60	6,23	0,59	6,00	6,99	5,11	3,12	3,73	3,44	---	---
22	-2,71	40,50	-2,45	12,91	-1,39	6,77	1,56	4,97	1,68	2,93	18,10	8,41	8,06	-2,35	-4,93
23	---	33,54	-1,68	5,45	-2,46	7,13	0,05	-3,14	2,99	3,34	6,02	4,97	-4,12	---	---

% de inhibición de AKT

Especificidad de Fab-Y para antígeno 1 -23

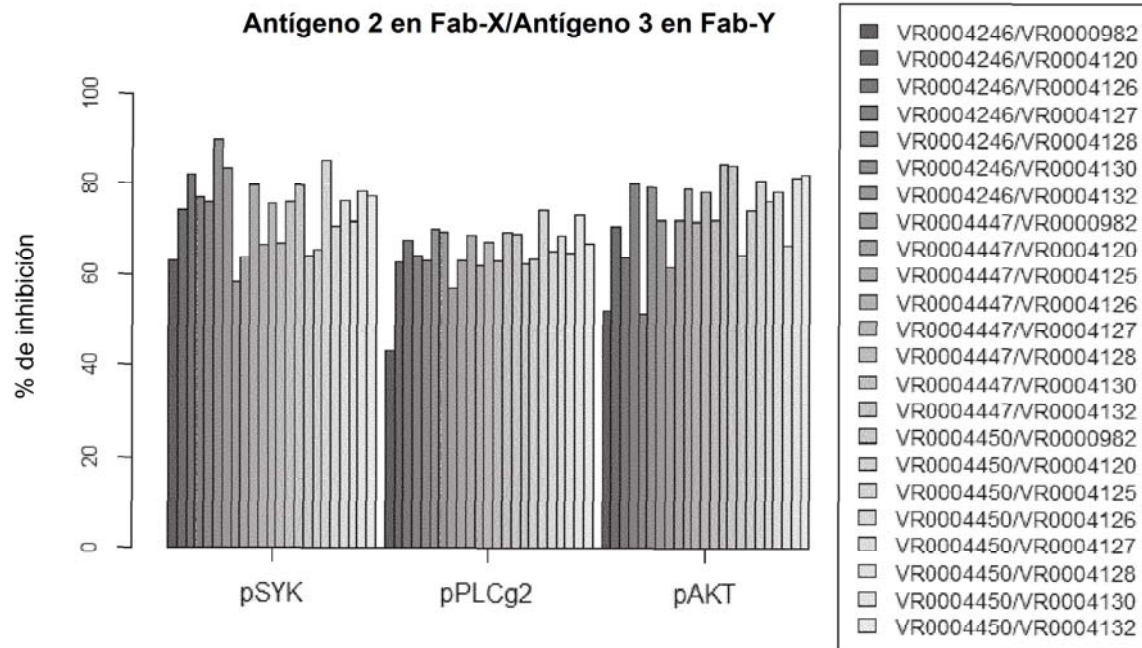


Figura 24

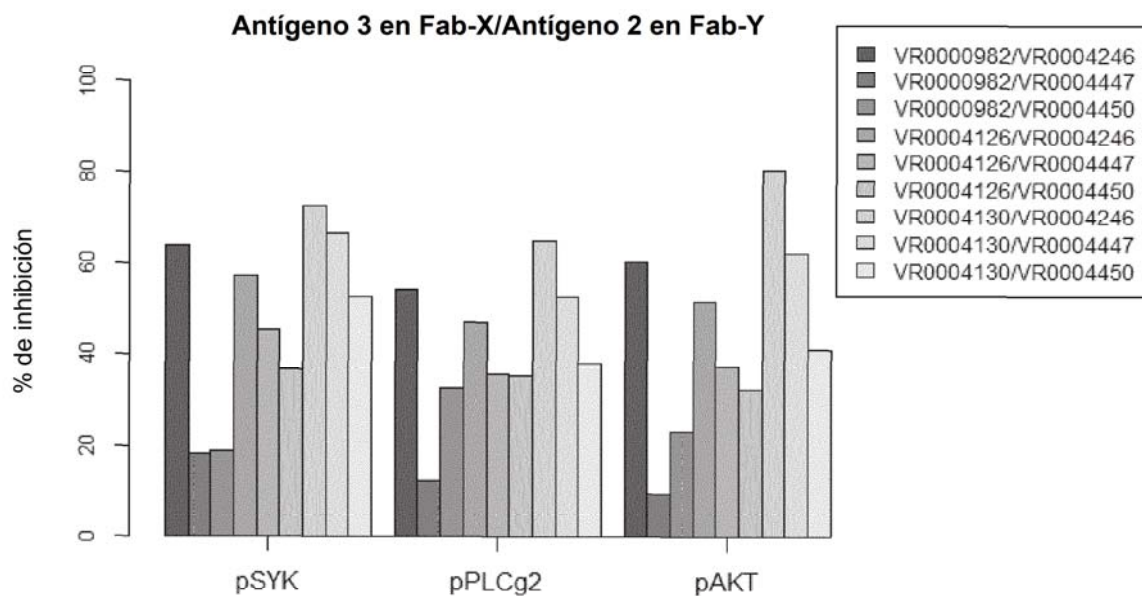


Figura 25

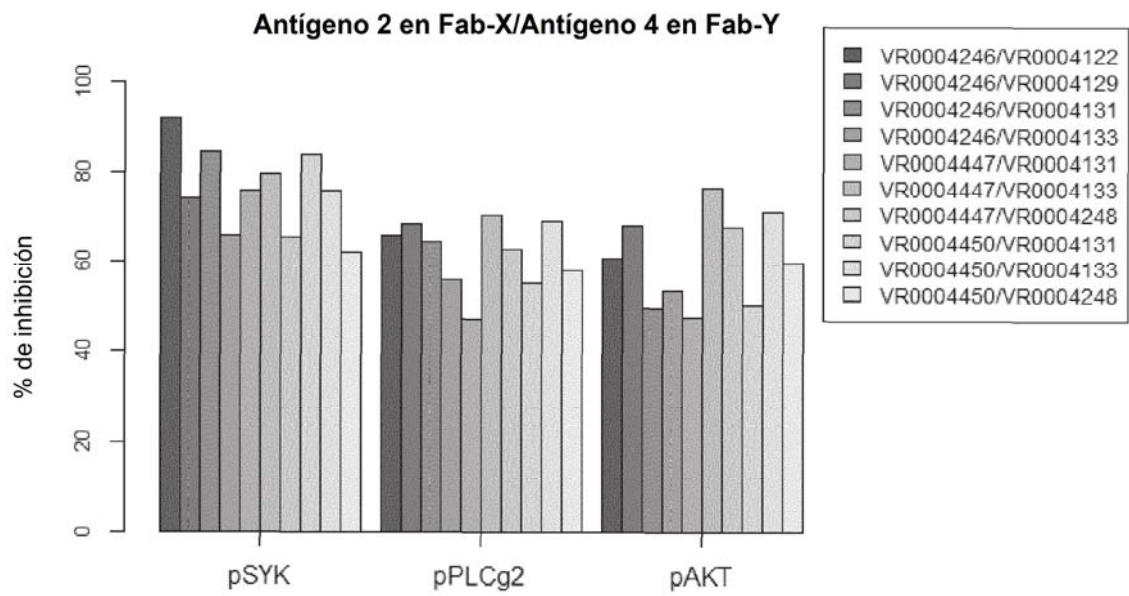


Figura 26

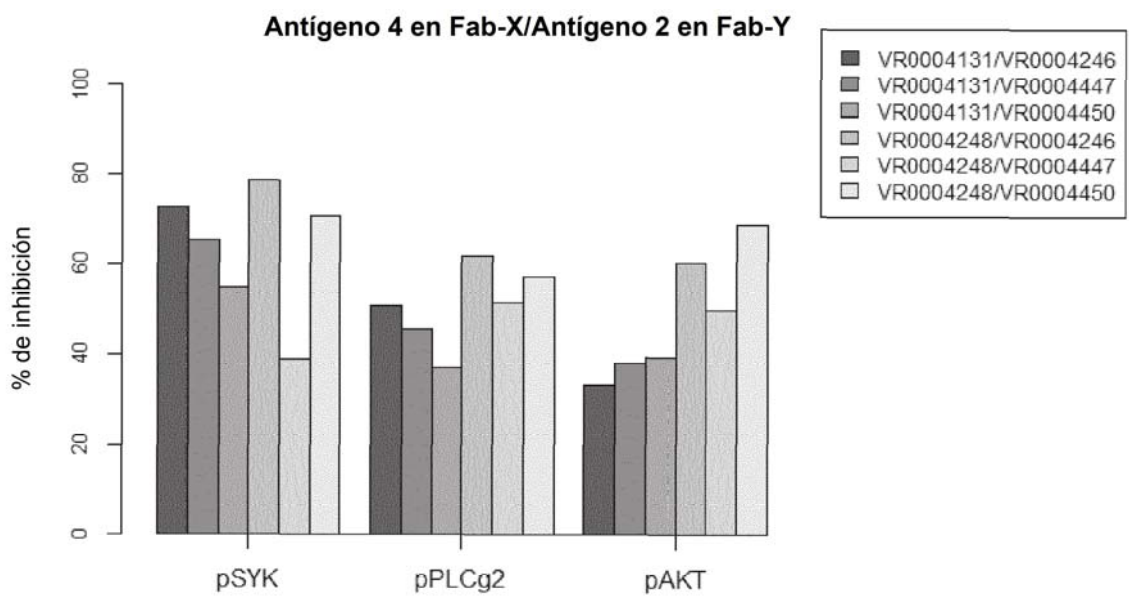


Figura 27

% de inhibición (Media +/- DT) de CD71 en células B estimuladas con anti-IgM

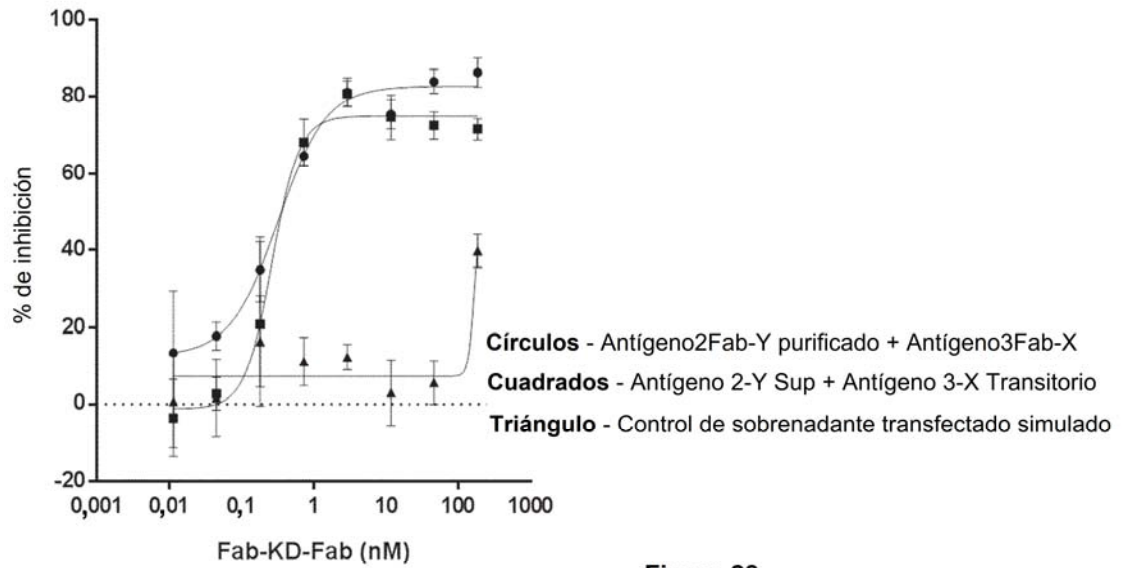


Figura 28

% de inhibición (Media +/- DT) de p38 fosforilada en células B estimuladas con anti-IgM

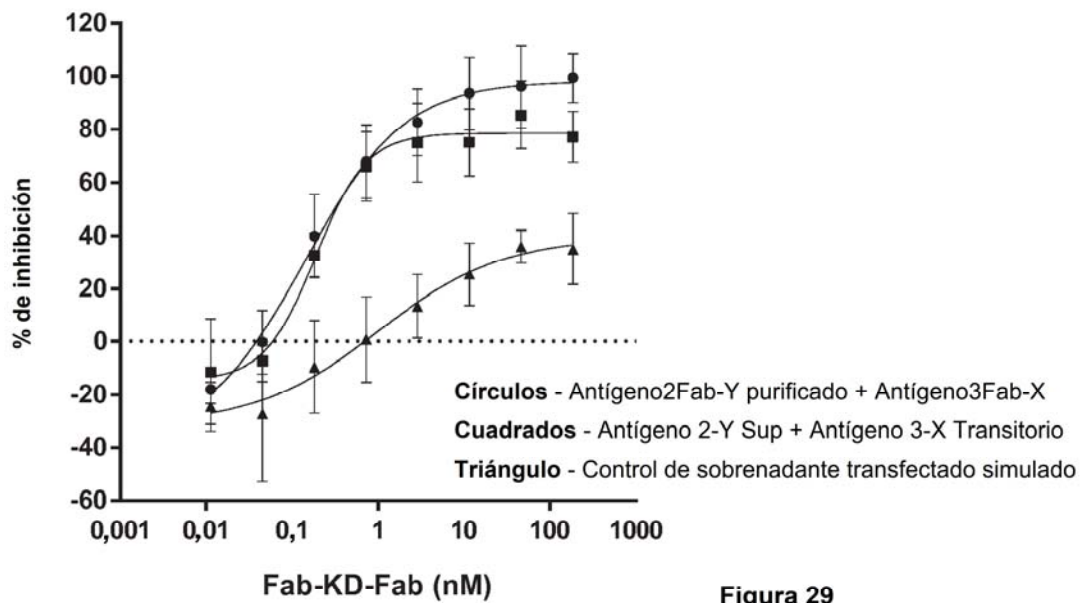


Figura 29

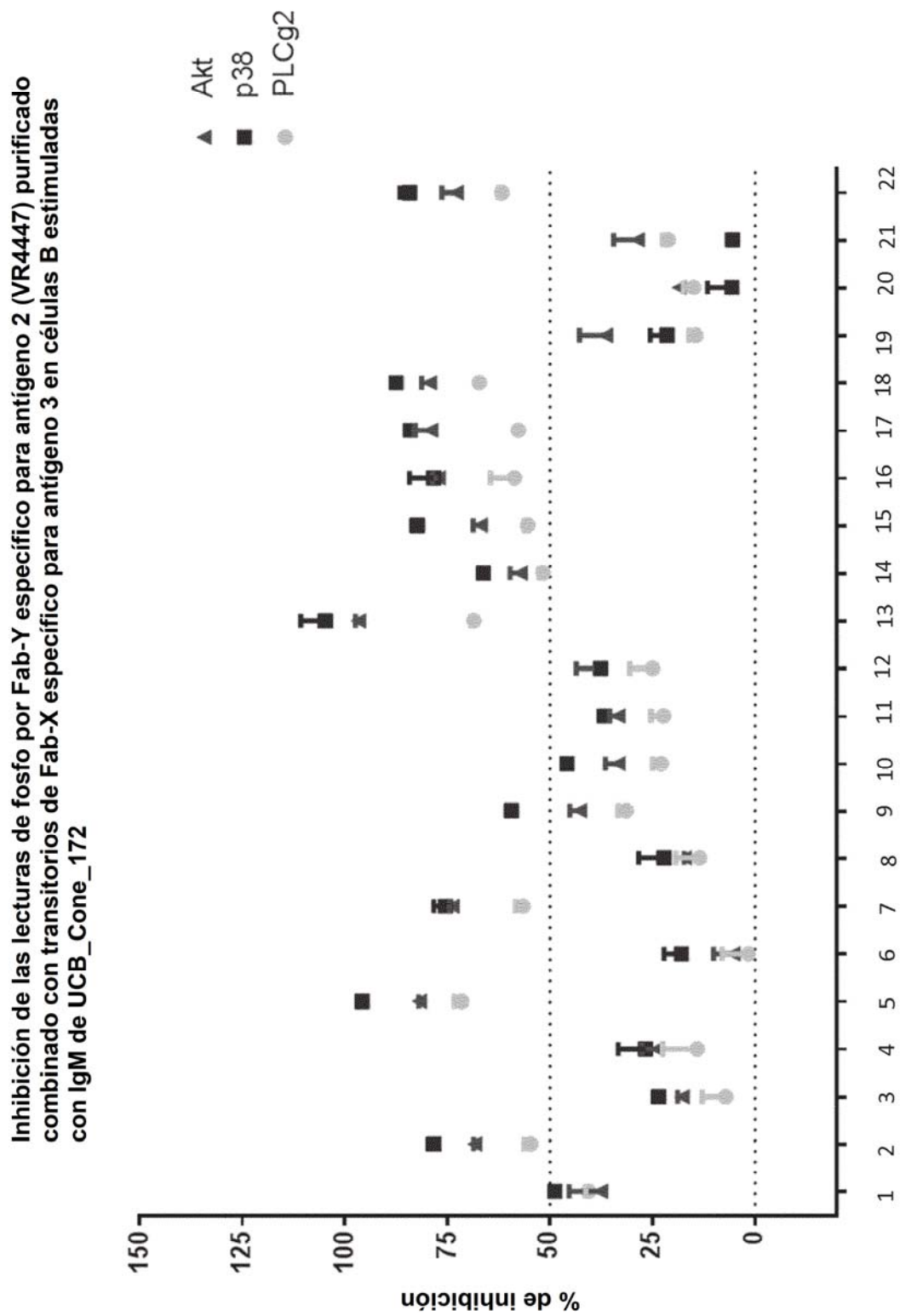


Figura 30

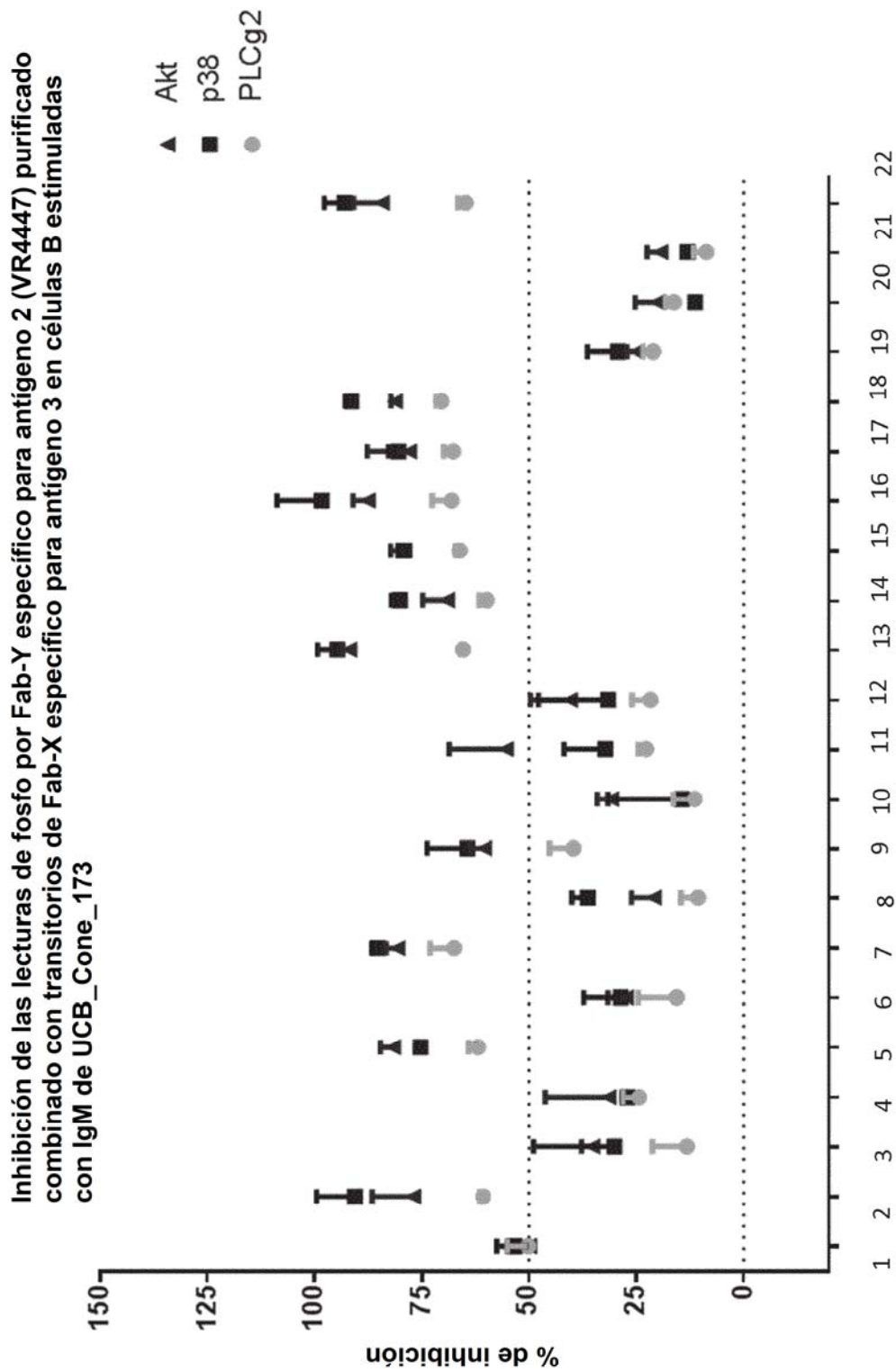


Figura 31

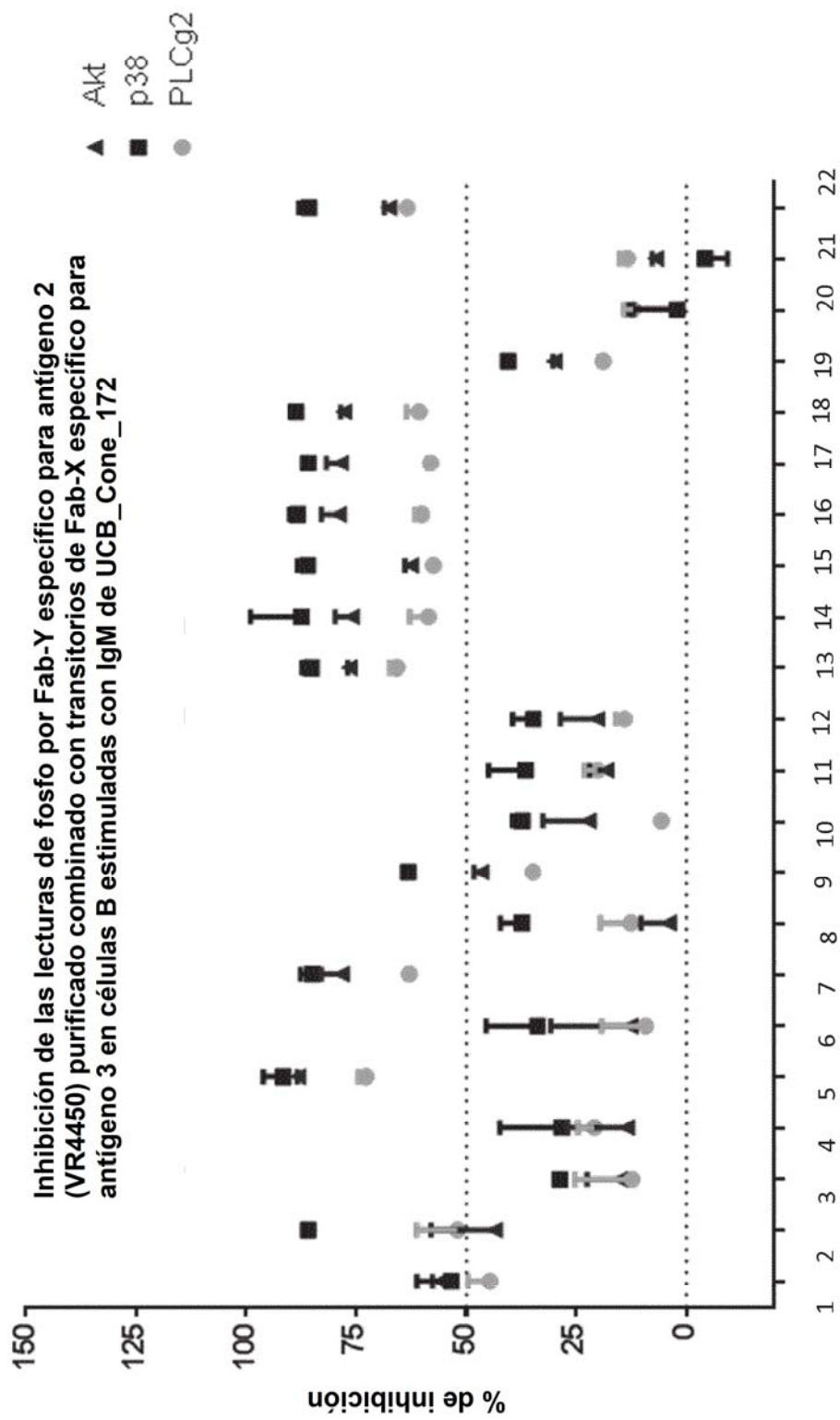


Figura 32

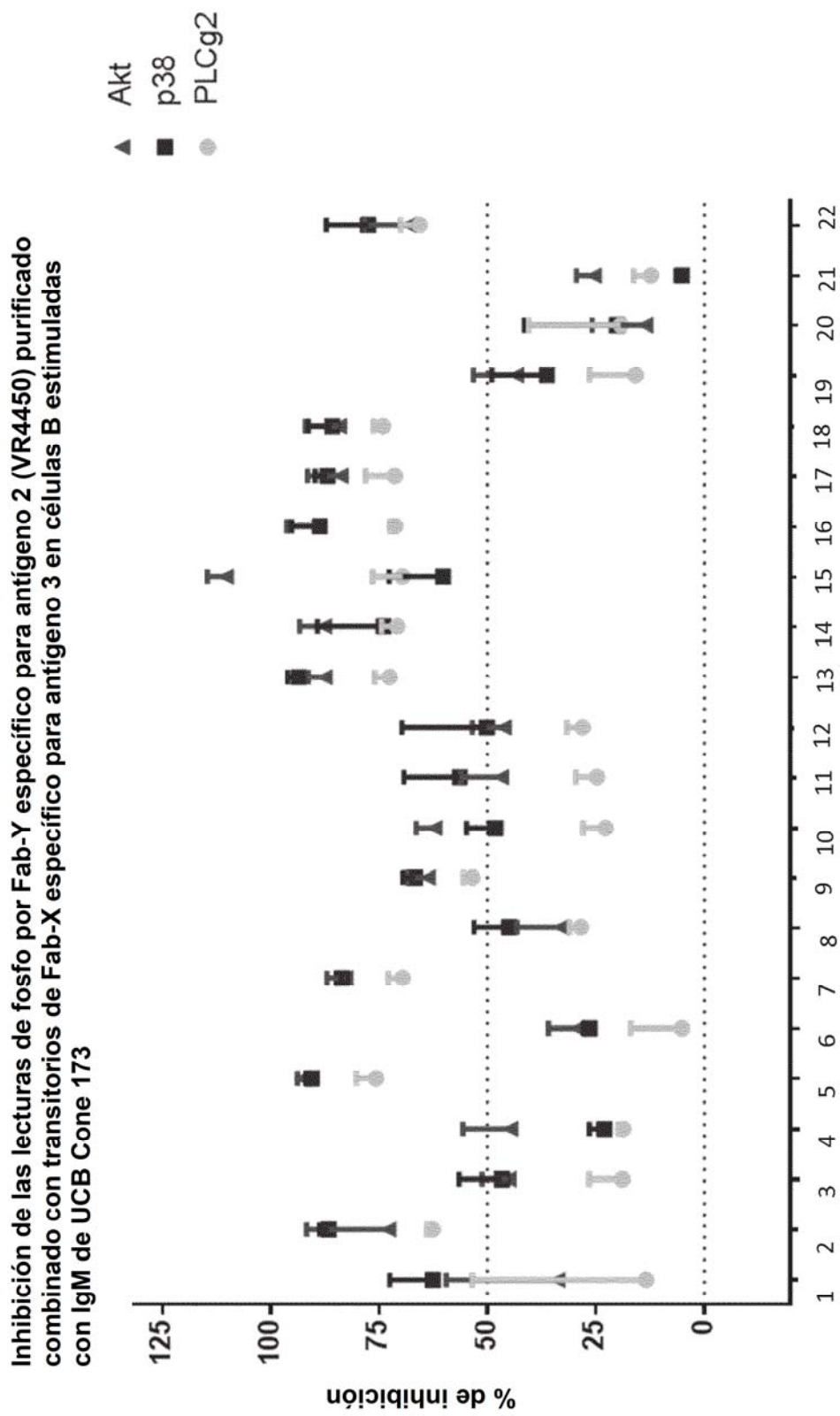


Figura 33

Figura 34

% de inhibición (+/- DT) de PLC γ 2 fosforilada en células B estimuladas con anti-IgM por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2.

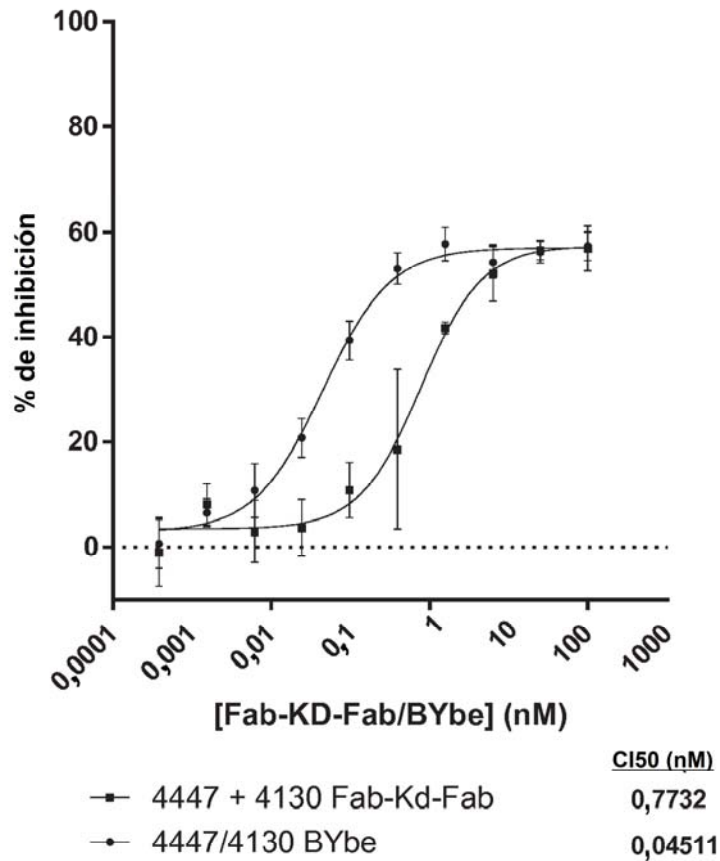


Figura 35

% de inhibición (+/- DT) de P38 fosforilada en células B estimuladas con anti-IgM por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2.

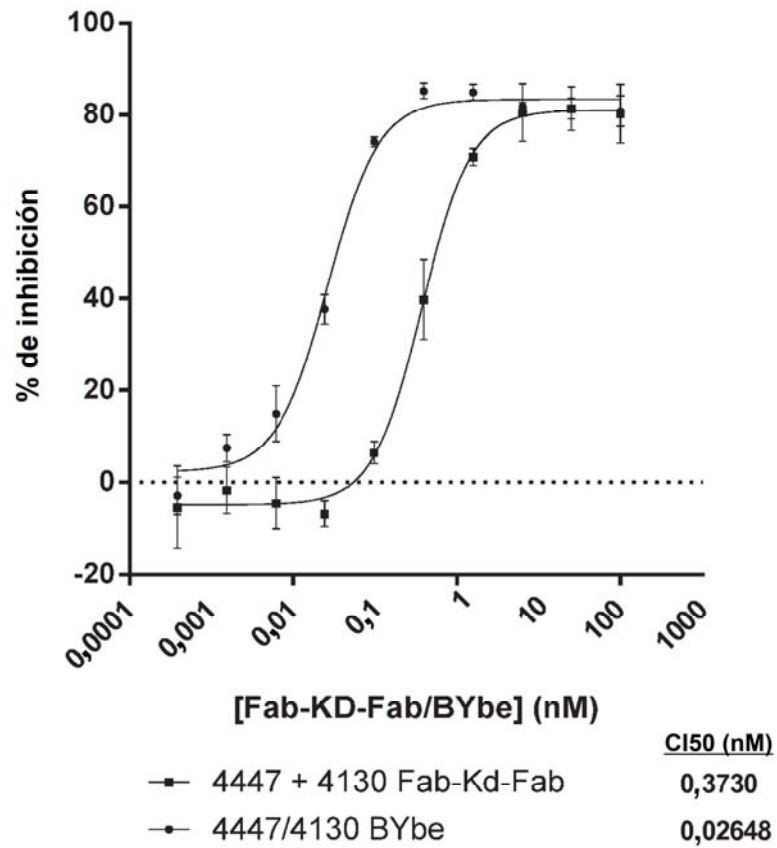


Figura 36

% de inhibición (+/- DT) de Akt fosforilada en células B estimuladas con anti-IgM por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2.

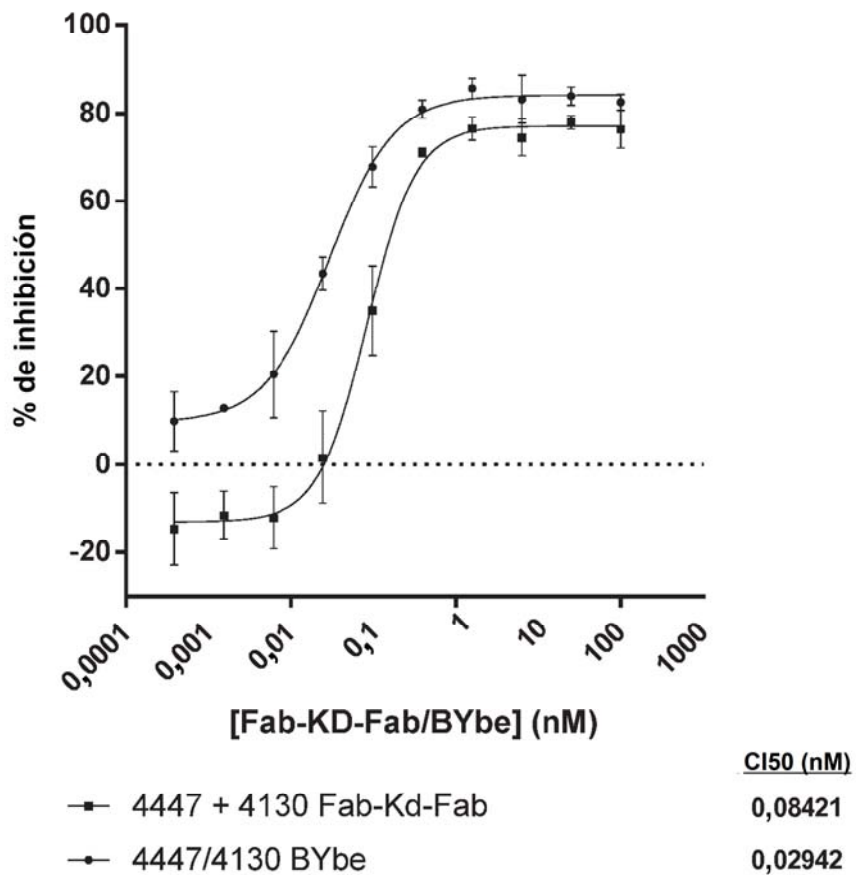


Figura 37

% de inhibición (+/- DT) de CD71 inducida por anti-IgM en células B por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2

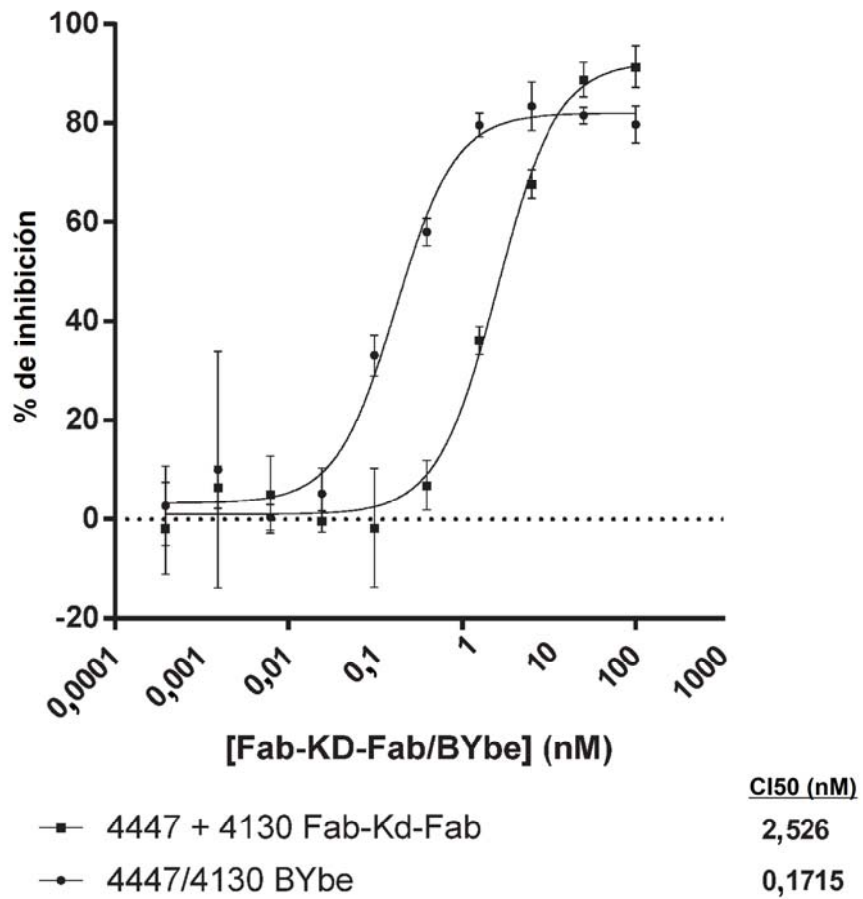


Figura 38

% de inhibición (+/- DT) de CD40 inducida por anti-IgM en células B por Fab-Kd-Fab o Bybe específico para antígeno 3 y antígeno 2

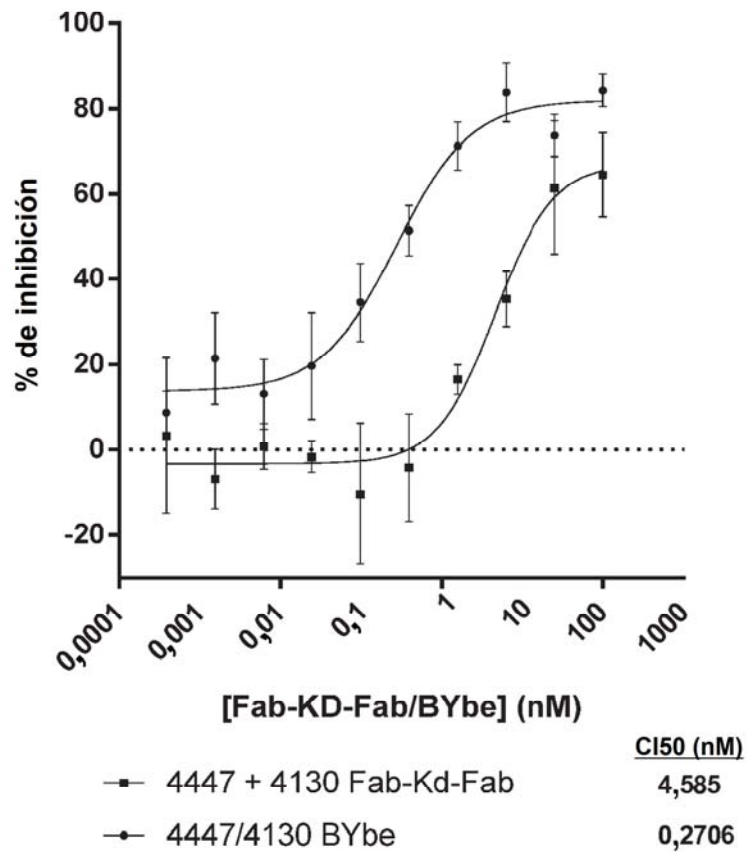


Figura 39

% de inhibición (+/- DT) de CD86 inducida por anti-IgM en células B por Bybe o Fab-Kd-Fab específico para antígeno 3 y antígeno 2

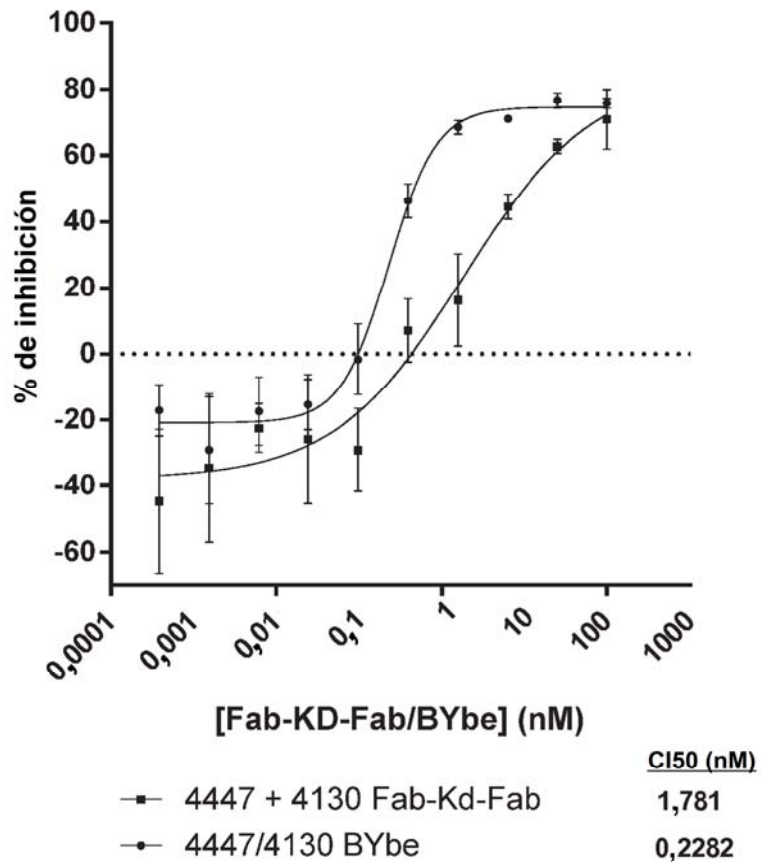


Figura 40

Porcentaje de inhibición de la expresión de CD27 en células B totales estimuladas con un anticuerpo anti-IgM anti-humano de cabra

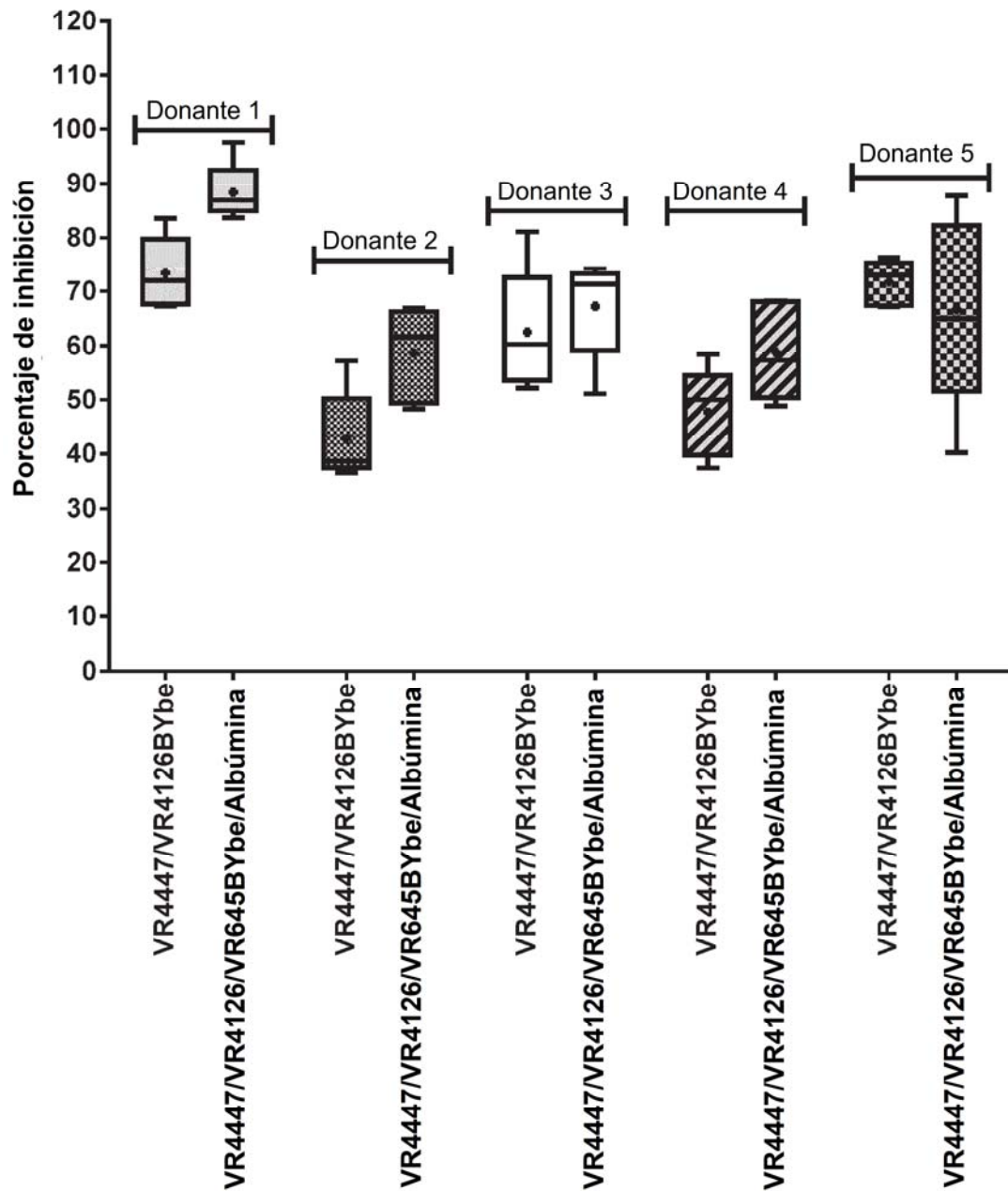


Figura 41

Porcentaje de inhibición de la expresión de CD71 en células B totales estimuladas con un anticuerpo anti-IgM anti-humano de cabra

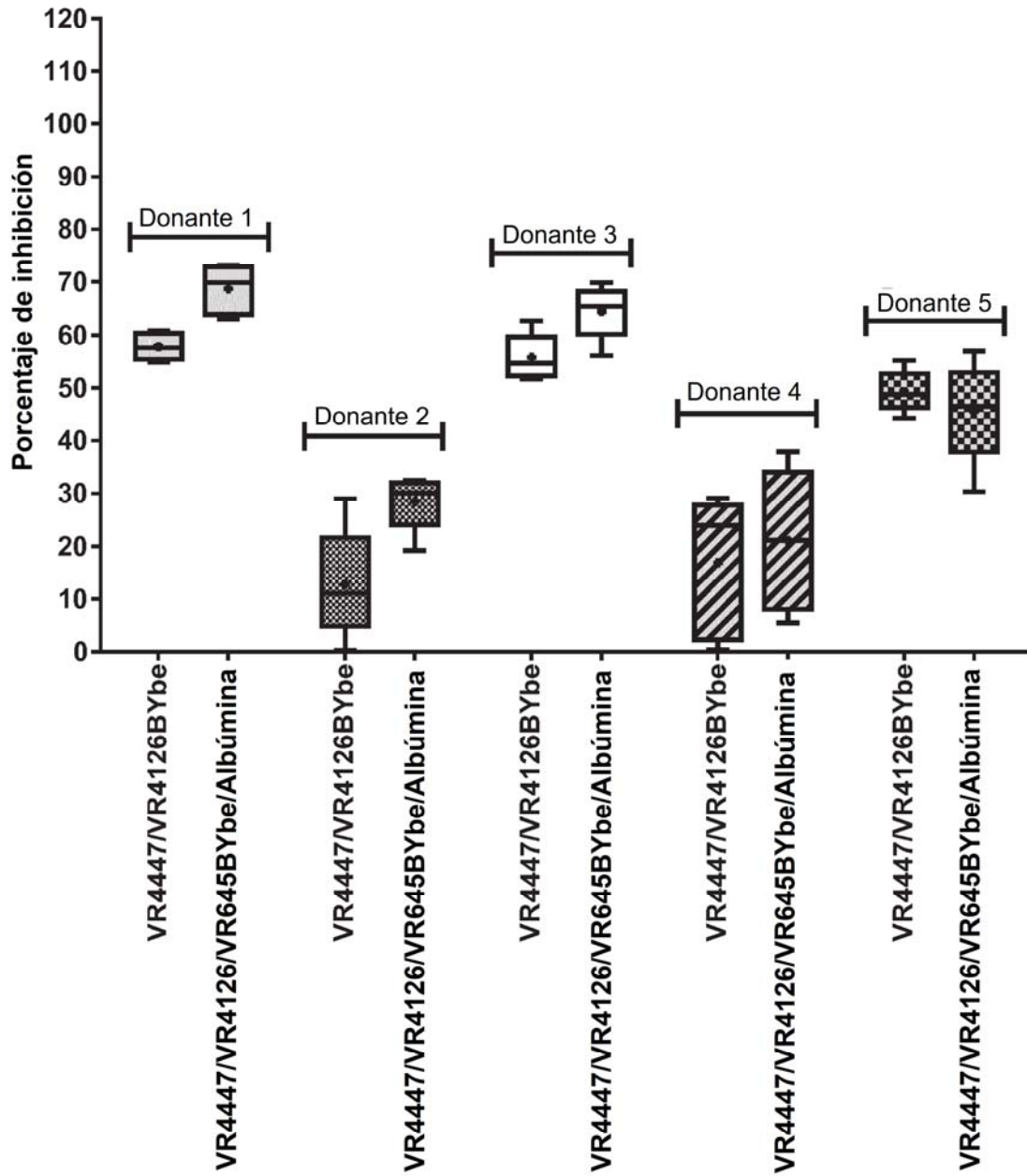


Figura 42

Porcentaje de inhibición de la expresión de CD86 en células B totales estimuladas con un anticuerpo anti-IgM anti-humano de cabra

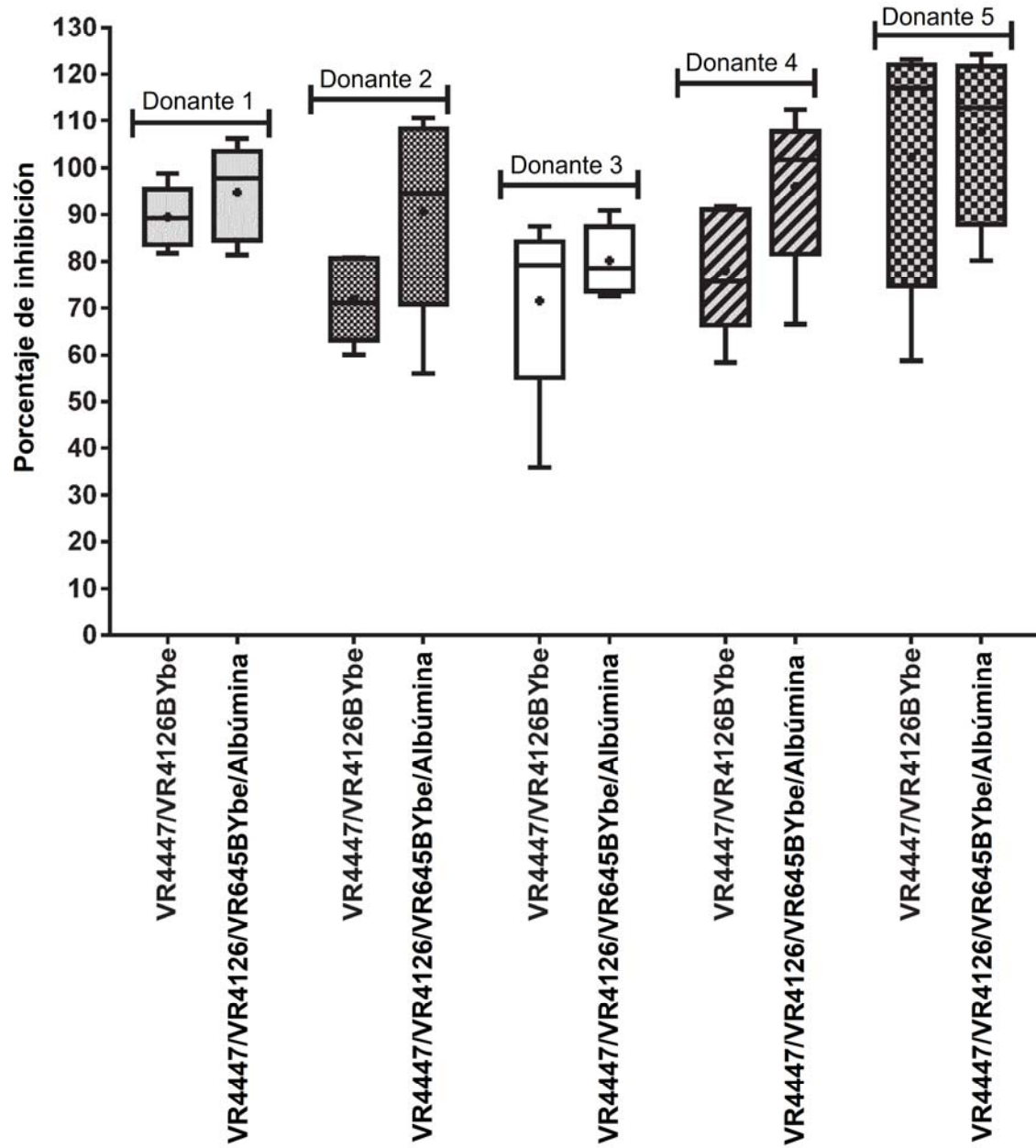


Figura 43

Porcentaje de inhibición de la expresión de CD27 en células B totales estimuladas con un anticuerpo anti-IgM anti-humano de cabra

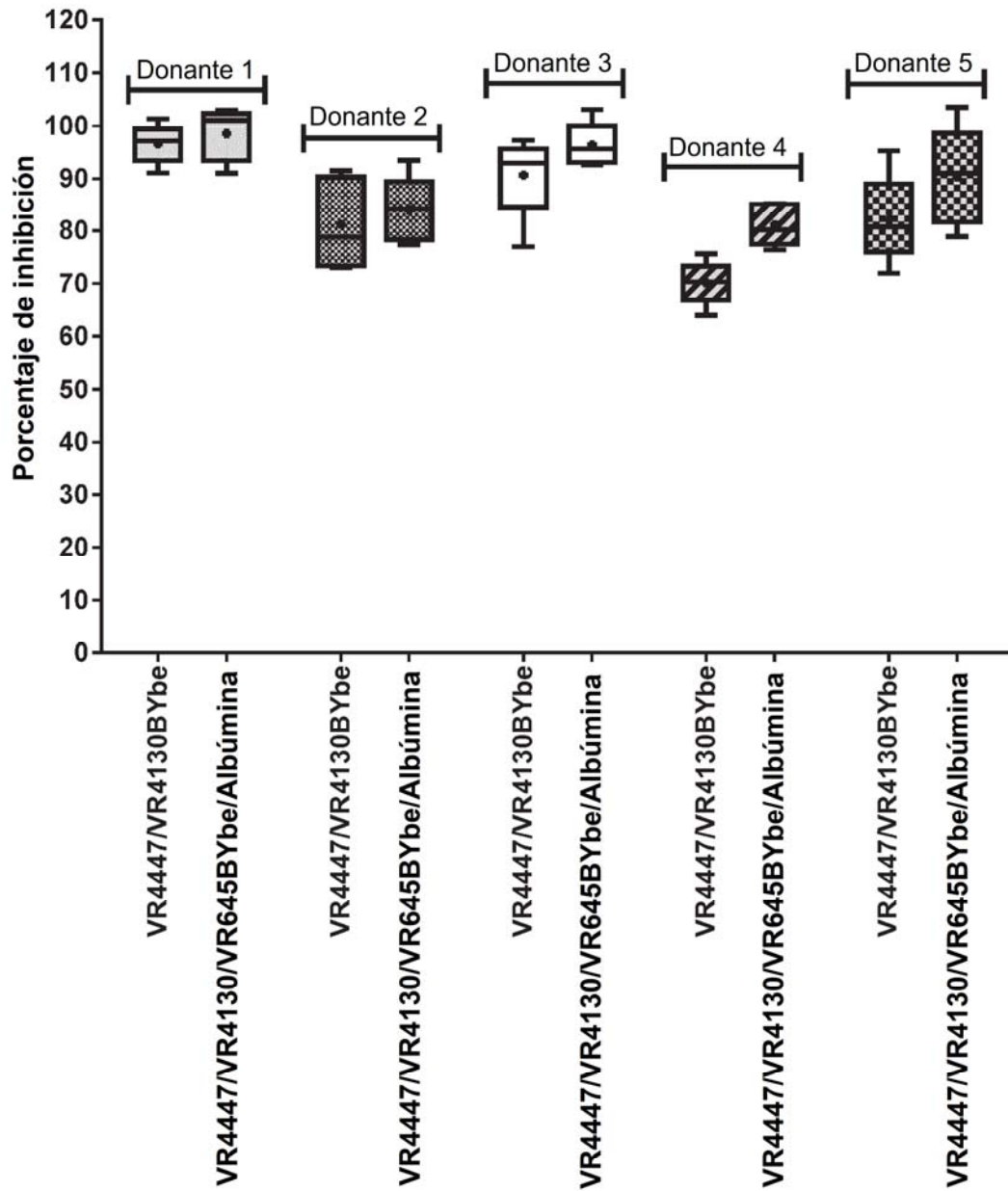


Figura 44

Porcentaje de inhibición de la expresión de CD71 en células B totales estimuladas con un anticuerpo anti-IgM anti-humano de cabra

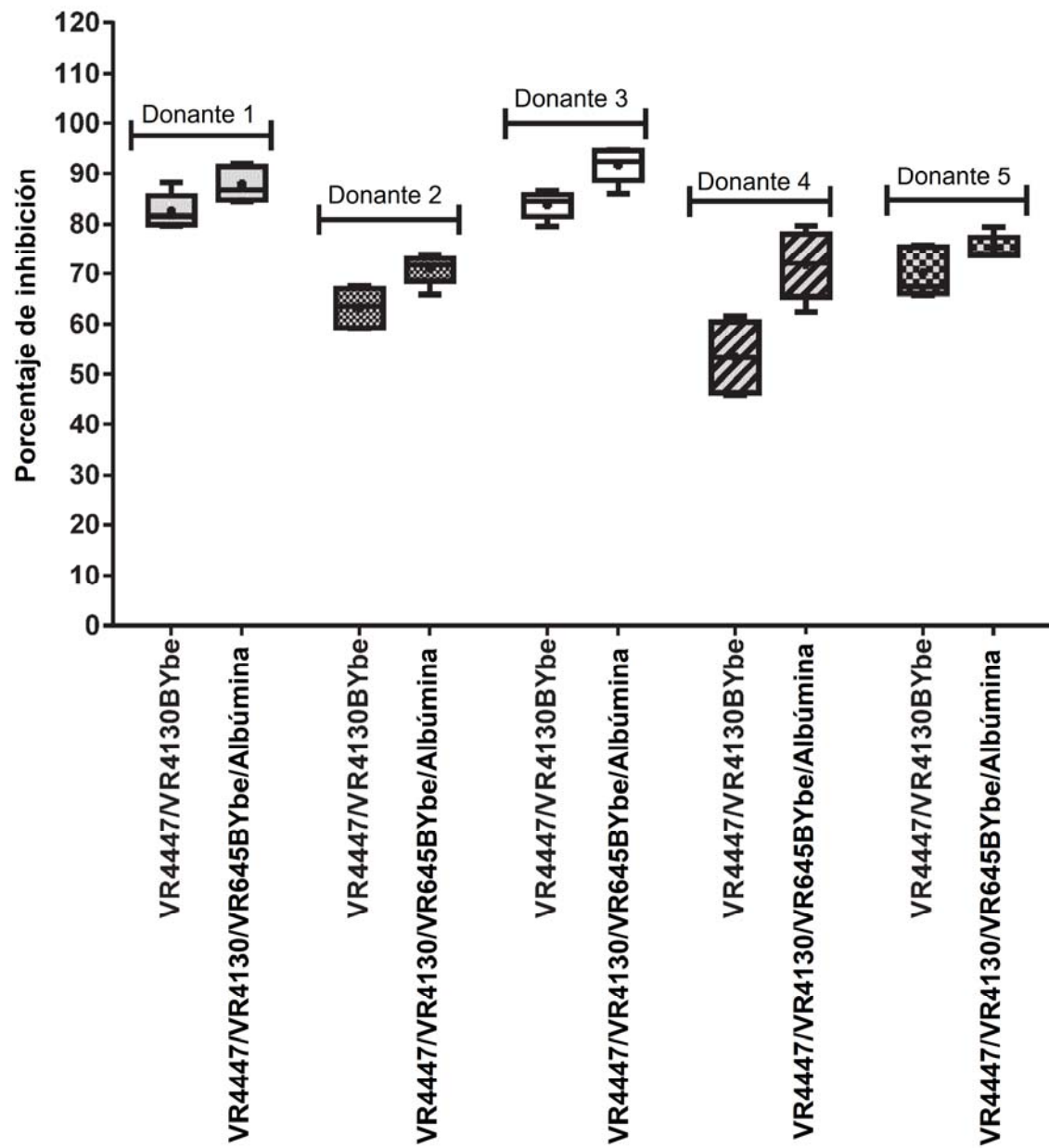


Figura 45

Porcentaje de inhibición de la expresión de CD86 en células B totales estimuladas con un anticuerpo anti-IgM anti-humano de cabra

