(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 907 717**

(51) Int. CI.:

C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2017 PCT/EP2017/076948**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2018 WO18077775**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2017 E 17794919 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.12.2021 EP 3529275**

(54) Título: **Proteínas y usos**

(30) Prioridad:

24.10.2016 GB 201617924

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

WRIGHT, MICHAEL JOHN;
ADAMS, RALPH;
BURNLEY, REBECCA y
ETTORRE, ANNA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Proteínas y usos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir un anticuerpo específico para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria, cuyo anticuerpo estabiliza la interacción proteína:proteína.

Antecedentes de la invención

En el cáncer, la mayoría de los antígenos asociados a tumores también se expresan en células y tejidos periféricos normales, aunque con diferente densidad. Normalmente se cree que el direccionamiento dual de dos antígenos en la misma célula conduce a una selectividad del objetivo mejorada frente a los tejidos normales que expresan solo uno o niveles bajos de ambos antígenos.

Un medio de dirigirse a dos antígenos en una célula tumoral es a través de un anticuerpo biespecífico (es decir, con un brazo del anticuerpo que reconoce un antígeno diana y el segundo brazo del anticuerpo que reconoce un segundo antígeno diana). Sin embargo, como se muestra en Mazor et al. *mAbs*, 7, 461-469, el direccionamiento dual por anticuerpos biespecíficos no siempre es suficiente para promover una selectividad de la diana eficiente. Los anticuerpos biespecíficos aún pueden reconocer células que expresan solo uno de los dos antígenos diana. Mazor et al. describieron que la afinidad de los brazos individuales del anticuerpo, así como la avidez y la valencia, juegan un papel importante en el direccionamiento. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico compuesto por un brazo anti-CD4 y un brazo anti-CD70 reconocía células que expresaban tanto CD4 como CD70, así como CD4 solo. Se prepararon variantes de afinidad reducida del brazo CD4 introduciendo mutaciones en las CDR. Estas variantes presentaban mejoras de selectividad; se redujo la unión a células que expresaban CD4 solo. Sin embargo, para generar tales anticuerpos biespecíficos se requiere una ingeniería extensa. Los anticuerpos biespecíficos también son inherentemente específicos para sus antígenos diana particulares. Por lo tanto, se necesitan diferentes anticuerpos biespecíficos para dirigirse a diferentes combinaciones de antígenos.

Otra técnica para reconocer múltiples antígenos en una célula diana se describe en el documento WO 2013/104804. Aquí, un resto dirigido para un primer antígeno "A" se une a un fragmento no activo de un dominio funcional. A continuación, se une un segundo resto dirigido para el antígeno "B" a un segundo fragmento no activo del dominio funcional. Cuando ambos antígenos están presentes en la superficie celular, la dimerización de los dos fragmentos da como resultado la formación de un dominio funcional.

Un fragmento puede ser un dominio V_L de un anticuerpo y el otro fragmento puede ser un dominio V_H de un anticuerpo dando como resultado un scFv cuando ambos antígenos están presentes en la célula diana. Sin embargo, también hay desventajas en este enfoque en el sentido de que V_H y V_L por sí mismos pueden tener problemas de estabilidad y el sistema puede tener fugas parciales. Los dominios V_H y V_L separados también pueden ser propensos a la agregación.

Existe la necesidad en la técnica de proporcionar medios mejorados para identificar y dirigirse específicamente a células diana (p. ej., células inmunitarias y células tumorales) con efectos secundarios mínimos.

Los autores de la presente invención han identificado un nuevo sistema con utilidad, entre otras cosas, para dirigirse específicamente a múltiples antígenos en células de interés. El sistema aprovecha las interacciones proteína:proteína transitorias (PPI) y, en particular, utiliza proteínas de unión de conexión que reconocen dos componentes de una PPI transitoria.

Un ejemplo de una PPI transitoria, que juega un papel fundamental en la fisiopatología de varias enfermedades, es la interacción entre la IL-6 y su receptor específico gp80, (también conocido como CD126). La IL-6 se une a gp80 para formar un heterodímero; esta primera etapa se caracteriza por fases rápidas de asociación y disociación (Ward et al. *The Journal of biological chemistry* 271, 20138-20144 (1996)). El complejo IL-6-gp80 luego puede unirse a gp130 para formar un heterotrímero, que a su vez se dimeriza para crear el complejo hexamérico activo responsable de los sucesos clave de señalización posteriores (Boulanger et al. *Science* 300, 2101-2104 (2003)). La IL-6 puede señalizar en *cis* o *trans*, dependiendo de si gp80 se expresa en la membrana celular o en una forma soluble generada por liberación (Mullberg et al. *European journal of immunology* 23, 473-480 (1993)). Ambas formas de gp80 son activas y se unen a la IL-6 (Rose-John et al. *Journal of leukocyte biology* 80, 227-236 (2006)). Los datos *in vitro* sugieren que la ruta de señalización *trans* se activa preferentemente durante la inflamación (Rose-John et al. *International journal of biological sciences* 8, 1237-1247 (2012)). A diferencia de gp130, que se expresa en una variedad de células, gp80 se expresa principalmente en la membrana de hepatocitos y células inmunitarias (Rose-John et al. *Journal of leukocyte biology* 80, 227-236 (2006)). Ni la IL-6 ni gp80 se unen a gp130, lo que indica que la IL-6 es presentada por gp80 en la conformación apropiada para luego reclutar a gp130. Rose-John et al. *Journal of leukocyte biology* 80, 227-236 (2006)).

La IL-6 media una serie de respuestas inmunitarias que incluyen el tráfico de linfocitos, la proliferación y diferenciación de células T, la producción de anticuerpos de las células B, la regeneración del hígado, la expansión/diferenciación de progenitores de la médula ósea y la amplia regulación de la respuesta inflamatoria (Galun, E. y Rose-John, S. *Methods in molecular biology* 982, 59-77 (2013) y Mihara et al. *Clin Sci* (Londres) 122, 143-159 (2012)). La IL-6 es un mediador

clave en una variedad de enfermedades, incluido el cáncer y la autoinmunidad (Hunter, CA y Jones, S.A. *Nature immunology* 16, 448-457 (2015)). Como tal, la IL-6 ha sido objetivo directamente (anticuerpos bloqueadores de IL-6) o indirectamente (anticuerpos bloqueadores de gp80; gp130-Fc) para intervenciones terapéuticas contra trastornos autoinmunitarios y cáncer (Rose-John et al. *Expert opinion on therapeutic targets* 11, 613-624 (2007), Calabrese, L.H. y Rose-John, S. *Nature reviews. Rheumatology* 10, 720-727 (2014), Shaw, S. et al. Discovery and characterization of olokizumab: a humanized antibody targeting interleukin-6 and neutralizing gp130-signaling. *mAbs* 6, 774-782 (2014), Atreya, R. et al, *Nature medicine* 6, 583-588 (2000), Nishimoto, N. et al. *Blood* 106, 2627-2632 (2005) y Milagre, C.S. et al. *Cancer research* 75, 1255-1264 (2015)).

Damanska et al. *Proc Nat Acad Sci USA* 1314-1319 (2011)) describe un VHH que estabiliza un dímero de una variante de microglobulina beta2.

El documento WO 2004/033485 describe un anticuerpo que reconoce un epítopo discontinuo en una proteína ensamblada, pero no parte del epítopo presente en cada polipéptido individual. El documento WO 2016/012363 describe un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de proteína:proteína, pero no a los miembros individuales del complejo.

Rubinstein et al. *Int J of Cancer* 124(1) 46-54 (1996) describe anticuerpos que se unen y estabilizan el epítopo de conexión formado entre las subunidades alfa y beta de MUC1.

L. Hancock, Tesis doctoral, Universidad de Londres (2010/2011) describe varios anticuerpos VHH y un método para generarlos; sin embargo, no describe cómo seleccionar un anticuerpo que se una a un epítopo de conexión y estabilice la interacción proteína:proteína transitoria.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo específico para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria, cuyo anticuerpo estabiliza la interacción proteína:proteína, comprendiendo dicho método:

(i) inmunizar a un animal con una proteína de fusión de la interacción proteína:proteína transitoria estabilizada;

(ii) seleccionar un anticuerpo que interaccione con el complejo estabilizado de la interacción proteína:proteína pero no con cada componente individual de la interacción proteína:proteína en ausencia del otro; y

(iii) determinar que el anticuerpo estabiliza la interacción proteína:proteína.

Descripción de las figuras

La figura 1 ejemplifica una modalidad de direccionamiento en dos etapas que utiliza un anticuerpo de conexión radiomarcado (óvalo unido a una estrella) con células cancerosas que expresan los antígenos A y B (diagramas inferiores) en comparación con un anticuerpo biespecífico (diagramas superiores). En la modalidad de direccionamiento en dos etapas, primero se dirigen anticuerpos a las células (cada una representada con cuatro óvalos), que son altamente específicos para los antígenos diana y que se fusionan con los componentes de la interacción reconocidos por el anticuerpo de conexión (el círculo recortado y el rectángulo). Por ejemplo, se dirige a las células un anticuerpo que se dirige al antígeno A fusionado con un componente de proteína de la interacción transitoria proteína/proteína reconocida por el anticuerpo de conexión. También se dirige a las células un segundo anticuerpo que se dirige al antígeno B fusionado con el segundo componente de proteína de la interacción transitoria proteína/proteína reconocida por el anticuerpo de conexión. A esto le sigue la administración del anticuerpo de conexión radiomarcado, que entrecruza los dos componentes. Este sistema permite el direccionamiento específico a células que expresan tanto el antígeno A como el antígeno B. Por el contrario, el anticuerpo biespecífico, como se muestra en los diagramas superiores, se dirige a las células que expresan el antígeno A solo o el antígeno B solo en cierta medida.

La figura 2 muestra cómo se podría usar un anticuerpo de conexión para activar/desactivar un efecto funcional biespecífico molecular (usando fusiones de anticuerpos como se describe en la figura 1). Nuevamente, el sistema de dos etapas con la administración de las fusiones de anticuerpos seguida por el anticuerpo de conexión permite un nivel de flexibilidad que no se puede lograr con un anticuerpo biespecífico. La adición del anticuerpo de conexión activa el efecto biológico.

La figura 3 ilustra cómo se puede utilizar un anticuerpo de conexión para entrecruzar dos células diana. Una vez más, el anticuerpo de conexión se administra después de las dos moléculas dirigidas (las fusiones de anticuerpos), lo que da como resultado el entrecruzamiento funcional de las dos poblaciones de células diana. El enfoque de direccionamiento en dos etapas permite un mayor control que con un anticuerpo biespecífico.

La figura 4 muestra un escenario de tres antígenos más complejo. Tal sistema podría usarse para juntar dos células, p. ej. célula diana con antígenos A y B y un efector para la destrucción celular (con el anticuerpo de conexión fusionado con un anticuerpo que se dirige a un antígeno en la célula efectora). Se proporciona una especificidad adicional al requerir que los dos anticuerpos dirigidos reconozcan los dos antígenos individuales (A y B) en la célula diana antes

de que el anticuerpo de conexión pueda acoplarse y atraer a la célula efectora. Esto combina esencialmente los modelos de las figuras 1 y 3.

La figura 5 muestra el direccionamiento específico a, p. ej. células cancerosas (lado izquierdo) por una célula efectora modificada (lado derecho) que se beneficia de la alta especificidad del anticuerpo de conexión con un enfoque de doble direccionamiento (a los antígenos A y B en la célula cancerosa). Este ejemplo amplía el uso del anticuerpo de conexión para dirigirse de nuevo solo específicamente a una población celular con dos antígenos. La célula efectora puede derivar del paciente o una línea celular humana modificada que expresa el anticuerpo de conexión como una proteína de fusión de la membrana celular. Estas células pueden administrarse a un paciente y pueden tener una vida prolongada. Solo con la administración de las fusiones de dos anticuerpos, estas células efectoras encontrarían su epítopo de conexión y conducirían a la muerte celular.

La Figura 6 muestra un ejemplo de cómo se puede usar un anticuerpo de conexión (marcado como JEA) para entrecruzar dos antígenos (Ag A y Ag B) en la superficie de una sola célula a través de fusiones de anticuerpos (Ab A con el componente A y Ab B con el componente B). Hay al menos cuatro interacciones proteína-proteína individuales (PPI) descritas que determinarán la eficacia con la que se entrecruzan los dos antígenos. La modulación de las interacciones permite un ajuste fino del sistema.

La Figura 7 muestra los resultados de los ensayos preliminares para probar que VHH6 solo reconocía el complejo IL-6-gp80. (a) ELISA: FusionIL-6, IL-6 o gp80 se inmovilizaron durante la noche en placas. VHH6 se une a FusionIL-6, pero no a IL-6 o gp80 solos. Cuando las placas se recubrieron con IL-6 y se añadió VHH6 con gp80, o se añadió VHH6 con IL-6 (en placas recubiertas con gp80), la absorbancia era comparable a FusionIL-6. eje y: Absorbancia a 630 nm; eje x: muestras. (b) Termoforesis a microescala (MST): IL-6 y gp80 se marcaron con NT647. Una curva de unión era evidente solo cuando se incubaron diferentes concentraciones de VHH6 con una mezcla de IL-6-NT647+gp80 o gp80-NT647+IL-6 (los dos paneles inferiores), pero no cuando se ensayaron IL-6-NT647 o gp80-NT647 solos. eje y: intensidad de la termoforesis; eje x: concentración de VHH6 (nM). (c) Interferometría de biocapa (Octet): se capturó VHH6 a través de su marcador de His en las puntas de Ni y se ensayaron soluciones de FusionIL-6, IL-6, gp80 e IL-6+gp80. Se registró un cambio del patrón de interferencia para VHH6 solo para las soluciones de FusionIL-6 o IL-6+gp80. eje y: cambio de longitud de onda (nm); eje x: tiempo (s). (d) Aislamiento por SEC de VHH6 en complejo con IL-6 y gp80. Soluciones de IL-6, gp80 y VHH6 solas y en combinación. La SEC de IL-6+VHH6, gp80+VHH6 da dos picos separados correspondientes al tiempo de elución de los componentes cargados individuales, mientras que el tiempo de elución de VHH6-IL-6-gp80 era compatible con la elución del complejo trimérico en comparación con la elución del complejo dimérico IL-6-gp80 (respectivamente, 9.378 min frente a 9.556 min). eje y: Absorbancia a 280 nm; eje x: tiempo (min).

La figura 8 muestra la estructura cristalina del complejo VHH6-IL-6-gp80. (a) Estructura cristalina de VHH6 unido simultáneamente a IL-6 y gp80. El epítopo cubre una superficie total de 924 $Å^2$, aportando la interfaz entre VHH6 e IL-6 414 $Å^2$ y aportando la interfaz entre VHH6 y gp80 510 $Å^2$. Las superposiciones de los átomos de carbono alfa de la cadena principal de IL-6 libre (1ALU) y gp80 libre (1N26) sobre los átomos equivalentes de VHH6-IL-6-gp80 no mostraban cambios significativos en la conformación con valores de desviación cuadrática media (rmsd) de 1.2 Å y 1.5 ± 0.1 Å, respectivamente. La figura de la derecha muestra el complejo rotado 90° alrededor del eje x. (b) CDR1 y CDR3 hacen contacto tanto con IL-6 como con gp80 mientras que CDR2 contacta solo con gp80. (c) En la interfaz de gp80, el resto de CDR3 Ser101 y los restos de CDR2 Ser30 y Thr31 (ambos átomos de oxígeno de la cadena principal) forman una red de enlaces de hidrógeno con la Ser228 y Arg231; el átomo de oxígeno de la cadena principal del resto de CDR2 Asn54 forma un enlace de hidrógeno con el átomo de nitrógeno de la cadena principal del Asp221; y el resto de la región armazón Asn74 forma un enlace de hidrógeno con el átomo de oxígeno de la cadena principal de la His256. (d) En la interfaz con IL-6, los restos de CDR3 Ser101 e Ile102 (átomo de nitrógeno de la cadena principal) forman enlace de hidrógeno con la Gln183; el resto de CDR3 Lys113 forma un puente salino con el Glu80; hay una interacción alifática entre la Tyr27 y Glu23; y el resto de CDR1 Tyr32 forma enlaces de hidrógeno con la Ser22 (véase también la figura 13 para más detalles).

La figura 9 muestra el análisis de HDX-MS del complejo VHH6-IL-6-gp80 y confirma el epítopo de conexión identificado por cristalografía e indica una dinámica estructural reducida en la interfaz de IL-6-gp80. Se aplicó el HDX-MS para cartografiar el epítopo del VHH comparando el HDX de un complejo de IL-6-gp80 purificado con el de un complejo de VHH6-IL-6-gp80 purificado. Después de la reacción de intercambio, las proteínas se digirieron con pepsina y los péptidos resultantes se analizaron por LC/MS. Se logró una cobertura de secuencia de 99.6% para gp80 y de 94.1% para IL-6. No se obtuvieron datos para los restos 179-184 (RALRQM; SEQ ID NO: 15) en el extremo C de la IL-6, que también se esperaba que interaccionara directamente con el VHH. Los datos de HDX-MS se representan en (a) la estructura cristalina de VHH6-IL-6-gp80 y (b) las secuencias de IL-6 y gp80. Los péptidos con captación diferencial de deuterio en presencia y ausencia del VHH6 con $p<0.01$ (prueba t de Student) para ≥ 2 puntos de tiempo se definen como significativos. (a) Imagen de la izquierda: la flecha indica el bucle hecho rígido tras la unión de VHH; imagen de la derecha: las flechas indican regiones implicadas en la interfaz de gp80-IL-6.

(b) Las regiones que muestran una disminución de HDX-MS en presencia de VHH6 están en negrita. Las regiones que muestran un aumento de HDX son de color más claro.

La Figura 10 muestra que la unión de VHH6 al complejo IL-6-gp80 cambia la velocidad de disociación del complejo

pero no afecta a la unión del complejo IL-6-gp80 a gp130. (a) El experimento de SPR cualitativo se realizó inmovilizando IL-6 sobre un chip CM5 e inyectando gp80. Las curvas representan un sensograma típico de gp80 sobre IL-6; y el sensograma resultante de gp80 sobre IL-6 con VHH6 inyectado al comienzo de la fase de disociación para gp80, mostrando una inhibición de la curva de disociación de gp80 (eje y: RU; eje x: tiempo (s)). (b) Se realizó la SPR cuantitativa inmovilizando IL-6 sobre un chip CM5 e inyectando gp80. Se ensayaron diferentes concentraciones de gp80 en ausencia o en presencia de un exceso de VHH6 (véase Materiales en línea). Se da k_d(k_{off}) encima de cada sensograma (eje y: RU; eje x: tiempo (s)) (kd y k_{off} se usan indistintamente en el presente documento). (c) se inmovilizó gp130 sobre un chip CM5. Se ensayaron una concentración en exceso fija de IL-6 y diferentes concentraciones de gp80 en presencia o ausencia de VHH6. El complejo IL-6-gp80 se une a gp130 con ka (kon) de 3.6×10^5 M^{-1} s^{-1} y *k*d (k_{off}) 0.037 s^{-1} mientras que el complejo VHH6-IL-6-gp80 se une a gp130 con ka (kon) de 4.7×10^5 M^{-1} s^{-1} y *k*d (k_{off}) 0.029 s^{-1} (eje y: RU; eje x: tiempo (s)). Los datos confirmaban que no hay diferencias significativas ni en la fase de asociación ni en la de disociación del complejo IL-6-gp80 con gp130 tras la adición de VHH6.

La Figura 11 muestra que la estabilización del complejo IL-6-gp80 por VHH6 aumenta la internalización de IL-6-NT647 a lo largo del tiempo y promueve una señal de fosforilación de STAT3 más alta y sostenida en células HUVEC. Las células HUVEC se trataron con IL-6+gp80 y VHH6+IL-6+gp80 o IL-6-NT647+gp80 y VHH6+IL-6-NT647+gp80. Tanto la señal fluorescente de pSTAT3 como la de IL-6-NT647 se cuantificaron en diferentes tiempos de medición utilizando el parámetro de "intensidad total de manchas por objeto". Se realizaron tres repeticiones diferentes para cada tiempo de medición (significación estadística: *=p≤0.05; **=p≤0.01 y ***=p<0,001). (a) Un experimento representativo que muestra la señal de pSTAT3 y la translocación nuclear a los 30 min. (Barra de escala = 20 µm). (b) Un experimento representativo de evolución temporal que muestra la señal de pSTAT3 a los 30, 180 y 360 min. (Barra de escala = 100 µm). (c) Análisis estadístico de la señal de pSTAT3 a lo largo del tiempo que muestra que VHH6 promueve y aumenta y mantiene la señal de pSTAT3. eje y: fluorescencia pSTAT3; eje x: tiempo (min).

Se usó IL-6 marcada con NT647 para rastrear la internalización a lo largo del tiempo del complejo IL-6-gp80. VHH6 aumentó significativamente la tasa de acumulación de IL-6-NT647 en vesículas de manera dependiente del tiempo, (d) Un experimento representativo de evolución temporal que muestra la señal de IL-6NT647 a los 30, 180 y 360 min. (Barra de escala = 20 µm). (e) Acumulación de IL-6-NT647 co-localizada con LAMP-1 (t = 360 min; Barra de escala = 20 µm). (f) Análisis estadístico de la intensidad de vesículas de IL-6-NT647 a los 15, 30, 90, 180 y 360 min. eje y: intensidad de vesícula de IL-6-NT647; eje x: tratamientos agrupados por tiempo de medición.

La figura 12 muestra el análisis transcriptómico de células HUVEC tratadas con VHH6-IL-6-gp80 y confirma la regulación por aumento selectiva de genes proinflamatorios. Se analizaron tres lotes diferentes de células HUVEC a los 30, 180 y 360 min. VHH6-IL-6-gp80 (muestra) se compararon con IL-6-gp80 (control). Para los genes que mostraban regulación por disminución o regulación por aumento, se representaron gráficamente los cambios de cada lote de células HUVEC en tres tiempos de medición diferentes y se agruparon según la función celular. (a) citoquinas, quimioquinas y receptores de quimioquinas; (b) factores de transcripción y reguladores de citoquinas; (c) quinasas. eje y: cambio; eje x: tiempo (min). Significación estadística: *=p≤0.05; **=p≤0.01 y ***=p≤0 001.

La figura 13 muestra enlaces de hidrógeno diferenciales en las dos copias de la unidad asimétrica cristalográfica. Hay dos copias del complejo VHH6-IL-6-gp80 en la unidad asimétrica cristalográfica. En una copia, el resto Ser22 de IL-6 forma un enlace de hidrógeno con el resto Tyr32 de VHH6 (izquierda), y en la segunda copia, la Ser22 forma un enlace de hidrógeno con el resto Tyr27 de VHH6 (derecha).

La figura 14 muestra un modelo de la estructura cristalina de VHH6—IL-6—gp80 superpuesto con gp130. La superposición de IL-6 y gp80 del complejo de señalización, IL-6-gp80-gp130 (código PDB 1P9M), mostró valores de r.m.s.d. bajos de 1.4±0.2 Å y 1.35±0.05 Å respectivamente, lo que indica que VHH6 mantiene juntas a la IL-6 y gp80 en una forma que es capaz de unirse a gp130.

La figura 15 muestra que la estabilización del complejo IL-6-gp80 por VHH6 promovía una señal de fosforilación de STAT3 más alta y sostenida en células HUVEC comparable a la proteína de fusión FusionIL-6. Las células HUVEC se trataron con FusionIL-6, IL-6+gp80 y VHH6+IL-6+gp80. La señal de fosforilación de STAT3 se cuantificó en diferentes puntos de tiempos utilizando el parámetro "intensidad total de manchas por objeto". Se realizó un análisis estadístico de la señal de pSTAT3 de tres repeticiones para cada punto de tiempo (significación estadística: *=p≤0.05; **=p≤0.01 y ***=p≤0.001). A diferencia de IL-6-gp80, en presencia de VHH6 o cuando se añadía FusionIL-6 al cultivo, pSTAT3 aumentaba en puntos de tiempo anteriores (30 min) y posteriores (180 min y 360 min). eje y: fluorescencia pSTAT3 expresada como intensidad total de manchas por objeto; eje x: tiempo (min).

La figura 16 muestra que el análisis transcriptómico de células HUVEC tratadas con VHH6-IL-6-gp80 confirmaba la regulación por aumento selectiva de genes proinflamatorios. Se analizaron tres lotes diferentes de células HUVEC a los 30, 180 y 360 min. VHH6-IL-6-gp80 (muestra) se compararon con IL-6-gp80 (control). Los datos se analizaron utilizando la plantilla de análisis de datos basada en la web de la matriz de PCR de perfilador RT2 v3.5 (http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis) y los cambios en la expresión génica se calcularon utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ con la normalización de los datos sin procesar respecto a los genes de mantenimiento. Los datos de las muestras se compararon con los controles (84 genes de 3 muestras y 3 controles) y se generó un mapa de calor utilizando el software Analyst de Genedata. La regulación génica para cada muestra se expresa como cambio en comparación con el control.

La figura 17 muestra la correlación entre los valores de k_{on}, k_{off} y K_D. En particular, la línea diagonal en negrita representa una K_D de 10 nM. Cualquier cosa a la derecha de la línea tiene una constante de disociación de equilibrio más alta (es decir, más débil) que 10 nM. Cualquier cosa a la izquierda de la línea tiene una constante de disociación más baja (es decir, más fuerte/mejorada) que 10 nM. La línea diagonal demuestra cómo una velocidad de disociación alta (un valor de k_{off} alto, p. ej., 10^0 s^{-1}) y velocidad de asociación alta (un valor de k_{on} alto, p. ej. 10^8 $M^{-1}s^{-1}$), o una velocidad de disociación baja (un valor de k_{off} bajo, p. ej. 10^{-6} s^{-1}) y una velocidad de asociación baja (un valor de k_{on} bajo, p. ej. 10^2 $M^{-1}s^{-1}$) pueden dar como resultado una constante de disociación de 10 nM.

La figura 18 muestra el alineamiento de la secuencia de VHH6 de llama con injertos humanizados de cadena pesada variable de VHH6 utilizando la línea germinal humana IGHV3-74 como la región armazón del aceptor. Las CDR se muestran en negrita/subrayadas. Los restos del donador se muestran en negrita/cursiva y están resaltados: F4, T24, F37, E44, R45, E46, G47, A49, Q72, V79 y A98. Las modificaciones a las CDR se muestran en negrita/subrayadas y están resaltadas: C33S, C104S.

Descripción de la lista de secuencias

Las SEQ ID NO: 1-8 muestran las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable de la cadena pesada y CDR del anticuerpo VHH6.

La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de IL-6 de la Figura 9 (secuencia completa de IL-6).

La SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de gp80 de la Figura 9 (secuencia de gp80 modificada como se usa en los ejemplos).

Las SEQ ID NO: 11-146 muestran las secuencias presentadas en los ejemplos.

Las SEQ ID NO: 147-153 muestran las CDR y las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos VHH6 humanizados.

La SEQ ID NO: 154 muestra la secuencia de la región armazón del aceptor IGHV3-74 IGHJH4 humano.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que las diferentes aplicaciones de los productos y métodos descritos pueden adaptarse a las necesidades específicas de la técnica. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito únicamente de describir realizaciones particulares de la invención, y no pretende ser limitante.

Además, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una secuencia de aminoácidos" incluye dos o más de tales secuencias, y similares.

Proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por una interacción transitoria proteína:proteína

La presente invención se refiere al concepto de una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria, cuya proteína de unión estabiliza la interacción proteína:proteína.

El concepto de "interacciones proteína:proteína transitorias" (o PPI) es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Nooren y Thornton (2003) *The EMBO Journal*, 22, 3486-3492 y Perkins et al. (2010) *Structure*. 18, 1233-1243. Las PPI se pueden distinguir en función del tiempo de vida del complejo. A diferencia de una interacción permanente que suele ser muy estable y, por lo tanto, existe en su forma de complejo, una interacción transitoria se asocia y disocia *in vivo*. Un complejo se califica como transitorio si sufre fácilmente cambios en su estado oligomérico.

Las PPI se pueden clasificar en función de la constante de equilibrio de disociación (K_D) que tiene en cuenta la velocidad de disociación del complejo (k_{off}) y la velocidad de asociación del complejo (k_{on}), donde:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

K_D se expresa en M, k_{off} se expresa en s^{-1} y k_{on} se expresa en $M^{-1}s^{-1}$.

Los métodos para investigar las interacciones proteína:proteína incluyen los cribados de dos híbridos de levadura (p. ej., cribados de dos híbridos de levadura repetidos, donde las interacciones transitorias a menudo se detectan en un solo cribado, mientras que las interacciones permanentes se detectan en múltiples cribados) y la purificación por afinidad en tándem junto con la espectrometría de masas. Tales técnicas se discuten en Perkins et al. (2010) *Structure*. 18, 1233-1243. Otra técnica utilizada para caracterizar las interacciones proteína:proteína es la RMN (véase Vonigradova y Qin (2012), *Top Curr Chem*, 326, 35-45).

En el contexto de la presente invención, es preferible usar la resonancia de plasmón de superficie (SPR; Biacore) para caracterizar la cinética de unión de la PPI. La SPR se describe en los ejemplos, y los protocolos/equipos que se usan

en los ejemplos pueden emplearse en la presente invención. En la invención, los experimentos de SPR se llevan a cabo normalmente a 25°C.

La PPI transitoria tiene preferiblemente una afinidad débil (constante de equilibrio de disociación; K_D). La K_D débil se caracteriza típicamente por una velocidad de disociación alta (rápida) (k_{off}). La PPI, en el contexto de la presente invención, puede caracterizarse tanto por una baja velocidad de asociación (k_{on}) como por una alta velocidad de disociación (k_{off}). En otras palabras, los dos componentes proteínas de la PPI preferiblemente tienen una formación de complejo baja en ausencia de la proteína de unión, y cualquier complejo formado se disocia rápidamente. Esta alta velocidad de disociación y baja velocidad de asociación hace que la PPI sea adecuada para los métodos que se describen a continuación. En algunos escenarios, la interacción proteína:proteína también puede tener una velocidad de asociación más alta, pero una velocidad de disociación rápida todavía significa que el complejo se disocia rápidamente, por lo que la interacción proteína:proteína sigue siendo adecuada para los métodos que se describen a continuación. En otras situaciones, también es posible que el complejo tenga una velocidad de disociación baja, pero una velocidad de asociación baja significa que la formación de complejo ocurre con poca frecuencia.

En ausencia de la proteína de unión, los componentes proteínas de la PPI transitoria pueden tener una unión indetectable entre sí o pueden tener una interacción insuficiente para dar como resultado la función corriente abajo del complejo. Por ejemplo, los dos componentes proteínas de la PPI pueden tener una unión indetectable utilizando técnicas tales como la filtración en gel (cromatografía de exclusión por tamaño molecular), ELISA o resonancia de plasmón de superficie. Estas técnicas se analizan más adelante y se utilizan en los ejemplos.

Con respecto a la falta de función corriente abajo, esto estaría determinado por la naturaleza de la PPI. Los presentes ejemplos utilizan la interacción IL-6/gp80, que se une a gp130 (véase arriba) y conduce a una serie de sucesos de fosforilación, que finalmente culminan en la fosforilación de STAT3. Por lo tanto, la unión de gp130 o la fosforilación de STAT3 podrían usarse como una medida de la interacción de IL-6 y gp80. Por ejemplo, mientras que la interacción IL-6/gp ya tiene una velocidad de disociación rápida, la interfaz de unión de las proteínas podría modificarse (mutar restos) para aumentar la velocidad de disociación y/o disminuir la velocidad de asociación y/o aumentar la constante de disociación de la interacción (una constante de disociación más alta significa una unión más débil). Entonces, la unión podría volverse indetectable usando las técnicas mencionadas anteriormente o podría reducir o eliminar la señalización corriente abajo.

Los componentes proteínas de la PPI transitoria también pueden tener una interacción insuficiente en ausencia de la proteína de unión para ver un resultado final en un paciente usando los métodos que se describen a continuación.

En ausencia de la proteína de unión, los componentes proteínas de la PPI transitoria pueden tener una unión entre sí cuando se evalúan por resonancia de plasmón de superficie a 25°C, que sigue un patrón similar al mostrado para la IL-6 y gp80 en ausencia de VHH6 en la Figura 10. Aquí, la curva del sensograma muestra una fase de disociación rápida para gp80, inhibiendo la adición de VHH6 la curva de disociación. A continuación se describen otros métodos que pueden usarse para detectar interacciones proteína:proteína.

Los dos componentes proteínas de la PPI pueden tener una constante de equilibrio de disociación (K_D) mayor de 1 nM, o preferiblemente mayor de 10 nM en ausencia de la proteína de unión. Más preferiblemente, esto podría significar una K_D de más de 1 µM o más preferiblemente incluso de más de 1 mM. Estas cinéticas de unión generalmente se determinan por resonancia de plasmón de superficie a 25°C. Como se mencionó anteriormente, la constante de equilibrio de disociación puede ser lo suficientemente débil como para que la unión de los dos componentes sea indetectable en ausencia de la proteína de unión.

La figura 17 ilustra la relación entre los valores k_{on}, k_{off} y K_D. La línea diagonal en negrita representa una K_D de 10 nM. Cualquier cosa a la derecha de la línea tiene una constante de disociación más alta (es decir, más débil) que 10 nM. Cualquier cosa a la izquierda de la línea tiene una constante de disociación más baja (es decir, más fuerte/mejorada) que 10 nM. La línea diagonal demuestra cómo una velocidad de disociación alta (un valor de k_{off} alto, p. ej., 10^0 s^{-1}) y velocidad de asociación alta (un valor de k_{on} alto, p. ej. 10^8 $M^{-1}s^{-1}$), o una velocidad de disociación baja (un valor de k_{off} bajo, p. ej. 10^{-6} s^{-1}) y una velocidad de asociación baja (un valor de k_{on} bajo, p. ej. 10^2 $M^{-1}s^{-1}$) pueden dar ambos como resultado una constante de disociación de 10 nM.

La PPI transitoria puede tener cualquier valor de k_{on} y k_{off} adecuado que de como resultado una K_D de más de 1 nM, preferiblemente más de 10 nM (es decir, valores de k_{on}, k_{off} que dan como resultado la caída de K_D a la derecha de las líneas de 1 nM o 10 nM en la Figura 17 respectivamente). Sin embargo, es típico que la constante de equilibrio de disociación débil se caracterice por una velocidad de disociación alta.

Los dos componentes proteínas de la PPI transitoria tienen preferiblemente una velocidad de asociación (k_{on}) en ausencia de la proteína de unión menor que 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ o incluso menor que 10 $M^{-1}s^{-1}$. Sin embargo, como se discutió anteriormente, la k_{on} puede ser mayor donde la PPI tiene una velocidad de disociación rápida. Por ejemplo, con una K_D mayor que 10 nM, la PPI podría potencialmente tener una velocidad de asociación menor que 10^8 $M^{-1}s^{-1}$, opcionalmente menor que 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, menor que 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ o menor que 10^3 $M^{-1}s^{-1}$.

Los dos componentes proteínas de la PPI transitoria típicamente tienen una velocidad de disociación (k_{off}) en ausencia de la proteína de unión mayor que 0.0001 s^{-1} (10^{-4} s^{-1}), preferentemente mayor que 0.001 s^{-1} (10^{-3} s^{-1}), más

preferentemente mayor que 0.01 s^{-1} (10^{-2} s^{-1}) y lo más preferentemente mayor que 0.025 s^{-1}. Estas velocidades de disociación pueden combinarse con una velocidad de asociación lenta, tal como las mencionadas anteriormente, pero una velocidad de asociación más alta con una velocidad de disociación rápida todavía haría que la PPI fuera útil para los métodos que se describen a continuación. De manera similar, como se discutió anteriormente, una velocidad de disociación más baja (p. ej. 10^{-7} s^{-1}, 10^{-6} s^{-1} o 10^{-5} s^{-1}) también podría combinarse con una velocidad de asociación baja y aún así dar como resultado una afinidad débil general.

Por ejemplo, para una constante de equilibrio de disociación superior a 10 nM:

La PPI puede tener una velocidad de disociación mayor que 10^{-7} s^{-1}, típicamente una velocidad de disociación mayor que 10^{-4} s^{-1}, preferiblemente una velocidad de disociación mayor que 10^{-3} s^{-1}, más preferiblemente una velocidad de disociación mayor que 10^{-2} s^{-1} e incluso más preferiblemente una velocidad de disociación mayor que 10^{-1} s^{-1}.

En el contexto de la presente invención, la proteína de unión específica para el epítopo de conexión creado por la PPI transitoria estabiliza la PPI. En términos de k_{on} para la interacción de las dos proteínas de la PPI, esta suele ser mayor que 10^2 $M^{-1}s^{-1}$, opcionalmente mayor que 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ en presencia de la proteína de unión. La K_{on} también podría ser mayor que 10^4 $M^{-1}s^{-1}$ o 10^5 $M^{-1}s$. La k_{off} para la interacción de las dos proteínas de la PPI es típicamente menos de 0.01 s^{-1}, opcionalmente menos de 0.001 s^{-1} o preferiblemente menos de 0.0005 s^{-1} en presencia de la proteína de unión. La constante de disociación (K_D) para la interacción de las dos proteínas de la PPI es normalmente menor que 10 nM, preferentemente menor que 1 nM o más preferentemente menor que 100 pM en presencia de la proteína de unión. Una vez más, estas cinéticas de unión suelen determinarse mediante resonancia de plasmón de superficie a 25°C.

El uso de una proteína de unión y la PPI en los métodos que se describen a continuación depende en gran medida de cuánto estabiliza la interacción la proteína de unión, en lugar de necesariamente valores específicos para la k_{off}, k_{on} y K_D. La K_D para la interacción proteína:proteína se puede reducir (es decir, mejorar) al menos 10 veces, al menos 50 veces o incluso al menos 100 veces en presencia de la proteína de unión. Incluso una estabilización de 10 veces de la interacción aumentaría en gran medida la utilidad terapéutica de un complejo y permitiría así su uso en uno de los métodos descritos a continuación. Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, la PPI transitoria se caracteriza por una k_{off} en ausencia de la proteína de unión mayor que 0.01 s^{-1}, mayor que 0.025 s^{-1} o incluso mayor que 0.04 s^{-1}. En presencia de la proteína de unión, la k_{off} se reduce preferiblemente a menos de 0.01 s^{-1}, opcionalmente menos de 0.001 s^{-1} o preferiblemente menos de 0.0005 s^{-1}. La estabilización de la PPI por la proteína de unión puede reducir la k_{off} al menos 50 veces, 100 veces o 200 veces. Una disminución en la k_{off} de al menos 10 veces podría ser suficiente para la estabilización de la PPI para encontrar uso en los métodos descritos a continuación.

Preferiblemente, tanto la k_{off} como la K_D se reducen (mejoran) al menos 10 veces, más preferiblemente al menos 50 veces y lo más preferiblemente al menos 100 veces en presencia de la proteína de unión.

En el contexto de la presente invención, la PPI transitoria preferiblemente no es entre dos dominios de un anticuerpo (es decir, entre los dominios V_H y V_L de un anticuerpo).

La PPI transitoria puede ser, por ejemplo, la interacción IL-6/gp 80. Otros ejemplos de PPI transitorias adecuadas incluyen potencialmente interacciones anticuerpo:antígeno.

Como se mencionó anteriormente, también se podría modificar una interacción proteína:proteína para que la cinética de la interacción la haga apropiada para la estabilización a través de una proteína de unión descrita en el presente documento y para su uso en los métodos descritos a continuación. Por ejemplo, los restos en la interfaz de unión para una interacción de alta afinidad/baja velocidad de disociación podrían mutarse para reducir la afinidad y/o aumentar la velocidad de disociación del complejo. Entonces, la interacción puede ser indetectable en ausencia de la proteína de unión utilizando técnicas tales como ELISA, filtración en gel (cromatografía de exclusión por tamaño molecular) o resonancia de plasmón de superficie.

En el contexto de la presente invención, la proteína de unión es específica (o selectiva) para un epítopo de conexión creado por la PPI transitoria. La proteína de unión se une específicamente en o sobre la conexión (interfaz) creada cuando los dos componentes proteínas de una PPI transitoria forman un complejo. Esto significa que la proteína de unión no es alostérica, es decir, la proteína de unión no reconoce un sitio creado cuando se juntan los dos componentes proteínas de la PPI que está ubicado lejos de la interfaz proteína:proteína.

"Se une selectivamente" o "reconoce selectivamente" una PPI transitoria significa que la proteína de unión se une con afinidad preferente o alta al complejo de PPI para el que es selectiva pero no se une sustancialmente, o se une con muy baja afinidad, a otras proteínas (p. ej., los componentes individuales de la PPI). Típicamente, como se analiza más adelante, la proteína de unión no tiene unión detectable a cada componente individual de la interacción proteína:proteína.

Por específico (o selectivo), se entenderá que la proteína de unión se une a la PPI de interés sin reactividad cruzada significativa con ninguna otra molécula, que puede incluir los componentes proteínas individuales de la PPI. La reactividad cruzada se puede evaluar mediante cualquier método adecuado descrito en el presente documento. La reactividad cruzada de una proteína de unión (tal como un anticuerpo) con una molécula que no sea la PPI se puede considerar significativa si la proteína de unión se une a la otra molécula al menos aproximadamente un 10%, al menos

20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50% tan fuertemente como se une al complejo de PPI de interés. Una proteína de unión que es específica (o selectiva) para la PPI puede unirse a otra molécula con menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20% o menos de aproximadamente 10% de la fuerza con la que se une al complejo de PPI. La proteína de unión puede unirse a la otra molécula con menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10% o menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1% de la fuerza con la que se une a la PPI. Es preferible una unión de menos de 10%, menos de 5% o menos de 1% para la unión a los componentes proteínas individuales de la PPI en comparación con la unión al complejo de PPI.

Las velocidades a las que una proteína de unión (bp, por sus siglas en inglés *binding protein*) se une a una PPI (u otra molécula) se denominan en el presente documento la velocidad de "asociación (*on*)" $k_{on\text{-}bp}$ y la velocidad a la que se disocia la proteína de unión se denomina en el presente documento velocidad de "disociación (*off*)" o $k_{off\text{-}bp}$. Como se usa en el presente documento, el símbolo "$K_{D\text{-}bp}$" denota la constante de disociación de unión de una proteína de unión para un complejo de PPI (u otra molécula). $K_{D\text{-}bp}$ se define como $k_{off\text{-}bp}/k_{on\text{-}bp}$.

El valor de la $K_{D\text{-}bp}$ de la proteína de unión para unirse a un complejo de PPI de interés puede ser al menos aproximadamente 10 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces o 500 veces menor (mejor) que el valor de la $K_{D\text{-}bp}$ para la unión a los componentes proteínas individuales de la PPI. Una unión tan baja no interferiría con el uso de la proteína de unión en los métodos descritos a continuación.

La afinidad de unión se puede dar en cualquier unidad apropiada, tal como µM, nM o pM. Cuanto menor es el valor de $K_{D\text{-}bp}$, mayor es la afinidad de unión de la proteína de unión al complejo de PPI.

La disminución del valor de la $K_{D\text{-}bp}$ de la proteína de unión para la unión al complejo de PPI en comparación con el valor de la $K_{D\text{-}bp}$ de la unión de la proteína de unión a los componentes individuales puede resultar de un aumento en la velocidad de asociación ($k_{on\text{-}bp}$) y/o una disminución en la velocidad de disociación ($k_{off\text{-}bp}$).

La velocidad de asociación ($k_{on\text{-}bp}$) de la proteína de unión que se une al complejo de PPI generalmente aumenta en comparación con la velocidad de unión de la proteína de unión a los componentes individuales de la PPI. La velocidad de disociación ($k_{off\text{-}bp}$) de la proteína de unión que se une al complejo de PPI generalmente disminuye en comparación con la velocidad de disociación de la proteína de unión que se une a los componentes individuales de la PPI. Más típicamente, la velocidad de asociación aumenta y la velocidad de disociación disminuye.

Los valores de $k_{on\text{-}bp}$, $k_{off\text{-}bp}$ y $K_{D\text{-}bp}$ pueden determinarse usando cualquier técnica apropiada, pero normalmente se determinan usando resonancia de plasmón de superficie a 25°C.

El valor de la $K_{D\text{-}bp}$ de la proteína de unión que se une a un complejo de PPI puede ser menor que 1 nM, menor que 500 pM, menor que 100 pM o menor que 10 pM

Lo más preferiblemente, la proteína de unión muestra una unión indetectable a los componentes proteínas individuales de la interacción proteína:proteína. En los ejemplos se describen métodos para identificar si una proteína de unión se une a un complejo formado por una interacción proteína:proteína, pero no a cada componente individual de la interacción proteína:proteína. Los métodos incluyen ELISA, donde los componentes proteínas individuales y un complejo de la PPI pueden inmovilizarse durante la noche en placas antes de la adición de la proteína de unión. Otras técnicas que se pueden utilizar para determinar si una proteína de unión se une a un complejo formado por una interacción proteína:proteína, pero no a cada componente individual de la proteína:proteína, son la cromatografía de exclusión por tamaño molecular (HPLC), la termoforesis a microescala o el Octet (interferometría de biocapa). Como se discutió anteriormente, también se puede usar la resonancia de plasmón de superficie. Una vez más, estas técnicas serán fácilmente conocidas por los expertos y se describen en los ejemplos. En el contexto de la presente invención, la proteína de unión puede mostrar una unión indetectable a cada componente individual de la PPI usando una cualquiera de, preferiblemente múltiples, más preferiblemente todas, las técnicas anteriores.

La proteína de unión se une a un epítopo que se extiende a lo largo de la interfaz entre los dos componentes proteínas del complejo de PPI. Entre 20% y 80% del epítopo está típicamente presente en una de las proteínas de la interacción proteína:proteína, estando el resto del epítopo presente en la otra proteína. Preferiblemente, entre 30% y 70% del epítopo está presente en una de las proteínas de la interacción proteína:proteína, estando el resto del epítopo presente en la otra proteína. Más preferiblemente, entre 40% y 60% del epítopo está presente en una de las proteínas de la interacción proteína:proteína, estando el resto del epítopo presente en la otra proteína. En el presente contexto, "epítopo" se refiere a los restos de aminoácidos reconocidos por la proteína de unión. En otras palabras, entre 20% y 80% de los aminoácidos reconocidos por la proteína de unión están típicamente presentes en una de las proteínas de la interacción proteína:proteína, estando el resto de los aminoácidos reconocidos por la proteína de unión presentes en la otra proteína. Preferiblemente, entre 30% y 70% de los aminoácidos reconocidos por la proteína de unión están presentes en una de las proteínas de la interacción proteína:proteína, estando el resto de los aminoácidos reconocidos por la proteína de unión presentes en la otra proteína. Más preferiblemente, entre 40% y 60% de los aminoácidos reconocidos por la proteína de unión están presentes en una de las proteínas de la interacción proteína:proteína, estando el resto de los aminoácidos reconocidos por la proteína de unión presentes en la otra proteína. Los métodos

para determinar un epítopo de unión se describen en los ejemplos a continuación e incluyen cristalografía y espectrometría de masas - intercambio de hidrógeno-deuterio. Por ejemplo, un resto del epítopo puede clasificarse como un resto dentro de los 4 Å de un resto del parátopo del anticuerpo.

Anticuerpo de conexión

La proteína de unión en el contexto de la presente invención es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (un anticuerpo de conexión). Un anticuerpo se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión al antígeno de las mismas. Cada cadena pesada se compone de una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena ligera se compone de una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de la cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones armazón (FR).

Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedante, incluidas varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

Un anticuerpo será típicamente un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos generados contra los complejos de PPI se pueden obtener, cuando es necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal (véase más adelante), p. ej. un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Se pueden inmunizar muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos, llamas o cerdos. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas suelen ser adecuados, al igual que los camellos o las llamas, para la generación de anticuerpos VHH.

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

Los anticuerpos también se pueden generar utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y expresión de ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15): 7843-78481; WO92/02551; WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los anticuerpos también se pueden generar utilizando varios métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkmann et al. (en *J. Immunol. Methods*, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (*J. Immunol. Methods,* 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (*Eur. J. Immunol*. 1994, 24:952-958), Persic et al. (*Gene*, 1997 187 9-18), Burton et al. (*Advances in Immunology*, 1994, 57:191-280) y documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (si están presentes) de las cadenas tanto pesada como ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, pero no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la región variable y opcionalmente la constante de inmunoglobulina murina han sido reemplazados por sus equivalentes humanos, p. ej. como se describe en términos generales en los documentos EP 0546073, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,661,016, US 5,770,429, EP 0438474 y EP 0463151.

Las moléculas de anticuerpo en el contexto de la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento o parte de unión al antígeno del mismo. La expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse selectivamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los anticuerpos y sus fragmentos y partes de unión al antígeno incluyen Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, $F(ab')_2$, Fv, anticuerpos de un solo dominio (p. ej., VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítopos 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 anticuerpos son bien conocidos en la

técnica (véase por ejemplo Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171 y fragmentos Fab-dAb descritos en la solicitud de patente internacional WO2009/040562. Estos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se pueden cribar según su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

En el contexto de la presente invención, el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo Fab, scFV o VHH. Estos tipos de anticuerpos tienen semividas en suero cortas y eliminación renal rápida, por lo que son útiles en los métodos terapéuticos descritos a continuación. Otros formatos de anticuerpos adecuados incluyen fenómeros, nanocuerpos humanos e IgNAR de tiburón.

Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que pueden ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, pueden usarse dominios de la región constante de la IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpo. Como alternativa, se pueden usar los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpo.

Un anticuerpo se puede preparar, expresar, crear o aislar por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina de interés o un hibridoma preparado a partir de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedante transformada para expresar el anticuerpo de interés, p. ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implican el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina con otras secuencias de ADN.

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones armazón como CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de la región armazón humanas.

Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Tal anticuerpo monoclonal humano puede ser producido por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, p. ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

Los anticuerpos humanos se pueden preparar por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguida de transformación de los linfocitos con el virus de Epstein-Barr.

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, p. ej., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humanizado" pretende hacer referencia a moléculas de anticuerpo con CDR injertadas en las que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias armazón humanas. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región armazón dentro de las secuencias armazón humanas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de anticuerpo con CDR injertada" se refiere a una molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluidas, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donador (p. ej., un anticuerpo monoclonal murino o de rata) injertado en una región armazón de región variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (p. ej., un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. En algunos casos, en lugar de que se transfiera toda la CDR, solo uno o más de los restos determinantes de la especificidad de una cualquiera de las CDR descritas anteriormente en el presente documento se transfieren a la región armazón del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). En algunas circunstancias, solo los restos determinantes de la especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente en el presente documento se transfieren a la región armazón del anticuerpo humano. En otras circunstancias, sólo los restos determinantes de la especificidad de cada una de las CDR descritas anteriormente en el presente documento se transfieren a la región armazón del anticuerpo humano.

Cuando se injertan las CDR o los restos determinantes de la especificidad, se puede usar cualquier secuencia de

región armazón de la región variable aceptora adecuada teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo donador del que derivan las CDR, incluidas las regiones armazón de ratón, primate y ser humano. Adecuadamente, el anticuerpo con CDR injertada tiene un dominio variable que comprende regiones armazón de aceptor humanas así como una o más de las CDR o restos determinantes de la especificidad descritos anteriormente. Por lo tanto, en un aspecto de la descripción se proporciona un anticuerpo con CDR injertada neutralizante en donde el dominio variable comprende regiones armazón de aceptor humanas y CDR de donador no humanas.

Ejemplos de regiones armazón humanas que se pueden usar son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., véase antes). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, pueden usarse secuencias de la línea germinal humana; estas están disponibles, por ejemplo, en: http://www.vbase2.org/ (véase Retter et al., *Nucl. Acids Res*. (2005) 33 (suplemento 1), D671-D674).

En un anticuerpo con CDR injertada, las cadenas pesada y ligera del aceptor no tienen que derivar necesariamente del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tienen regiones armazón derivadas de cadenas diferentes.

Además, en un anticuerpo con CDR injertada, las regiones armazón no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los restos inusuales pueden cambiarse por restos que ocurren con mayor frecuencia para esa clase o tipo de cadena aceptora. Alternativamente, restos seleccionados en las regiones armazón del aceptor pueden cambiarse para que correspondan al resto que se encuentra en la misma posición en el anticuerpo donador (véase Reichmann et al., 1998, *Nature*, 332, 323-324). Dichos cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donador. Se expone un protocolo para seleccionar restos en las regiones armazón del aceptor que pueda ser necesario cambiar en el documento WO 91/09967.

Un experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos pueden experimentar una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y extensión de estas modificaciones a menudo dependen de la línea celular hospedante utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un resto básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ. *Journal of Chromatography* 705: 129-134, 1995).

La cadena pesada del anticuerpo puede comprender un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, lo que le da a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga global "observada" dependerá de la secuencia absoluta de aminoácidos de la entidad, el entorno local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el que una molécula o superficie en particular no lleva carga eléctrica neta. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento según la presente descripción tiene un punto isoeléctrico (pI) de al menos 7. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento tiene un punto isoeléctrico de al menos 8, tal como 8.5, 8.6, 8.7, 8.8 o 9. En algunos casos, el pI del anticuerpo es 8. Se pueden usar programas tales como ** ExPASY http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html_(véase Walker, The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), 571-607) para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

La proteína de unión puede no ser un anticuerpo biespecífico, donde un brazo del anticuerpo biespecífico se pone en contacto con un componente proteína de la PPI y el segundo brazo del anticuerpo biespecífico se pone en contacto con el segundo componente proteína de la PPI.

Por lo general, una sola región variable de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento del mismo tiene interacciones con ambas proteínas de la PPI transitoria, una sola región variable de la cadena ligera tiene interacciones con ambas proteínas de la PPI transitoria o las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la ligera tienen interacciones con ambas proteínas de la PPI transitoria. En otras palabras, una única región variable de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento del mismo se pone en contacto con ambas proteínas de la PPI transitoria, una única región variable de la cadena ligera se pone en contacto con ambas proteínas de la PPI transitoria o tanto la región variable única de la cadena pesada como de la ligera se ponen en contacto con ambas proteínas de la PPI transitoria. Esto puede determinarse mediante cristalografía de rayos X, donde el contacto puede definirse como restos en el espacio de 4 Å de un resto de parátopo del anticuerpo. Además, se puede utilizar el análisis mutacional y el análisis de cambios en la cinética de unión.

Preferiblemente, una o más CDR individuales del anticuerpo interaccionan con ambas proteínas de la PPI. Por ejemplo, una de las CDR de la cadena pesada, posiblemente dos CDR de la cadena pesada, o incluso las tres CDR de la cadena pesada pueden interaccionar con ambas proteínas de la PPI. Asimismo, una de las CDR de la cadena ligera, posiblemente dos CDR de la cadena ligera, o incluso las tres CDR de la cadena ligera pueden interaccionar con ambas proteínas de la PPI. En otras palabras, una o más CDR individuales del anticuerpo se ponen en contacto con ambas proteínas de la PPI. Por ejemplo, una de las CDR de la cadena pesada, posiblemente dos CDR de la

cadena pesada, o incluso las tres CDR de la cadena pesada pueden ponerse en contacto con ambas proteínas de la PPI. Asimismo, una de las CDR de la cadena ligera, posiblemente dos CDR de la cadena ligera, o incluso las tres CDR de la cadena ligera, pueden ponerse en contacto con ambas proteínas de la PPI. Una vez más, esto puede determinarse mediante cristalografía de rayos X (donde el contacto puede definirse como restos en el espacio de 4 Å del resto de parátopo del anticuerpo), opcionalmente en combinación con análisis mutacional y medición de cambios en la cinética de unión.

Cuando la PPI es la interacción IL-6/gp80, el anticuerpo o fragmento de la descripción puede comprender al menos una secuencia de CDR de cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NO: 2-4. Estas son las CDR del anticuerpo VHH6 descrito en los ejemplos. El anticuerpo puede comprender una HCDR3 de SEQ ID NO: 4. El anticuerpo puede comprender adicionalmente una HCDR1 de SEQ ID NO: 2 y/o una HCDR2 de SEQ ID NO: 3.

El anticuerpo de la descripción también puede comprender las secuencias de CDR presentes en la SEQ ID NO: 1 (el V_H de VHH6) según lo determinado por los métodos de Kabat o Chothia. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y los expertos los entenderán fácilmente.

El anticuerpo de la descripción también puede comprender un V_H de SEQ ID NO: 1

Alternativamente, el anticuerpo de la descripción es un anticuerpo VHH6 humanizado. Específicamente, dicho anticuerpo puede comprender al menos una secuencia de CDR de cadena pesada seleccionada de las SEQ ID NO: 147 y 148. El anticuerpo puede comprender una HCDR3 de SEQ ID NO: 152 o 153. El anticuerpo puede comprender adicionalmente una HCDR1 de NO: 149 o 150 y/o una HCDR2 de SEQ ID NO: 151. Más específicamente, dicho anticuerpo comprende HCDR1 de SEQ ID NO: 149, HCDR2 de SEQ ID NO: 151 y HCDR3 de SEQ ID NO: 152. Alternativamente, dicho anticuerpo comprende HCDR1 de SEQ ID NO: 150, HCDR2 de SEQ ID NO: 151 y HCDR3 de SEQ ID NO: 153. El anticuerpo de la descripción puede ser o comprender alternativamente una variante de una de las secuencias específicas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, eliminación o adición de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores.

Un anticuerpo variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20 o más sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos de las secuencias específicas descritas anteriormente. Las variantes de "eliminación" pueden comprender la eliminación de aminoácidos individuales, eliminación de pequeños grupos de aminoácidos tal como 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o eliminación de regiones de aminoácidos más grandes, tal como la eliminación de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "sustitución" normalmente implican la sustitución de uno o más aminoácidos por el mismo número de aminoácidos y hacer sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, un aminoácido puede sustituirse por un aminoácido alternativo que tenga propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que pueden usarse para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Asp	polar, hidrófilo, cargado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, cargado (-)	Gln	polar, hidrófilo, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
His	aromático, polar, hidrófilo, cargado (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, cargado (+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrofóbico, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

Los "derivados" o "variantes" generalmente incluyen aquellos en los que, en lugar del aminoácido natural, el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural del mismo. Los aminoácidos usados en las secuencias también se pueden derivatizar o modificar, p. ej, marcar, con la condición de que la función del anticuerpo no se vea afectada adversamente de manera significativa.

Los derivados y variantes descritos anteriormente se pueden preparar durante la síntesis del anticuerpo o por modificación posterior a la producción, o cuando el anticuerpo está en forma recombinante usando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o escisión enzimática y/o ligado de ácidos nucleicos.

Una variante de anticuerpo de la descripción puede tener una secuencia de V_H al menos 90% (preferiblemente 95%) idéntica a la SEQ ID NO: 1. Una variante puede tener al menos 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, pero

conservando las secuencias de CDR exactas de las SEQ ID NO: 2, 3 y 4.

Una variante de anticuerpo de la descripción puede tener una secuencia de V_H al menos 90% (preferiblemente 95%) idéntica a la SEQ ID NO: 147 o 148. Una variante puede tener al menos 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 147 o 148, pero conservando las secuencias de CDR exactas correspondientes de SEQ ID NO: 149-153.

Este nivel de identidad de aminoácidos puede verse en toda la longitud de la secuencia de SEQ ID NO relevante o a lo largo de una parte de la secuencia, tal como en aproximadamente 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 o más aminoácidos, dependiendo del tamaño del polipéptido de longitud completa. Normalmente, la identidad se mide a lo largo de toda la longitud de la secuencia relevante.

En relación con las secuencias de aminoácidos, "identidad de secuencia" se refiere a secuencias que tienen el valor establecido cuando se evalúan utilizando ClustalW (Thompson et al., 1994, véase antes) con los siguientes parámetros:

Parámetros de alineamiento por pares -Método: preciso, Matriz: PAM, Penalización por apertura de hueco: 10.00, Penalización por extensión de hueco: 0.10;

Parámetros de alineamiento múltiple -Matriz: PAM, Penalización por apertura de hueco: 10.00, % de identidad para retraso: 30, Penalización por huecos finales: activada, Distancia de separación de huecos: 0, Matriz negativa: no, Penalización por extensión de hueco: 0.20, Penalizaciones por hueco específico de restos: activada, Penalizaciones por hueco hidrófilo: activada, Restos hidrófilos: GPSNDQEKR. Se pretende que la identidad de secuencia en un resto particular incluya restos idénticos que simplemente se han derivatizado.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona anticuerpos que tienen secuencias específicas y variantes que mantienen la función o actividad de estas cadenas.

Una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 5 codifica el V_H de SEQ ID NO: 1.

La presente descripción también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y/o ligera(s) de cualquier molécula de anticuerpo de la presente descripción. Adecuadamente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente descripción.

Una secuencia de polinucleótido adecuada puede ser alternativamente una variante de una de estas secuencias de polinucleótidos específicas. Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, eliminación o adición de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores. Un polinucleótido variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 75 o más sustituciones y/o eliminaciones de ácido nucleico de las secuencias dadas en la lista de secuencias. Generalmente, una variante tiene 1-20, 1-50, 1-75 o 1-100 sustituciones y/o eliminaciones.

Las variantes adecuadas pueden ser al menos aproximadamente 70% homólogas a un polinucleótido de una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento, normalmente al menos aproximadamente 80 o 90% y más adecuadamente al menos aproximadamente 95%, 97% o 99% homólogas a las mismas. Las variantes pueden conservar al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad. Las variantes conservan típicamente de aproximadamente 60% - aproximadamente 99% de identidad, aproximadamente 80% - aproximadamente 99% de identidad, aproximadamente 90% - aproximadamente 99% de identidad o aproximadamente 95% - aproximadamente 99% de identidad. La homología y la identidad a estos niveles generalmente están presentes al menos con respecto a las regiones codificantes de los polinucleótidos. Los métodos para medir la homología son bien conocidos en la técnica y los expertos en la técnica entenderán que en el presente contexto, la homología se calcula basándose en la identidad del ácido nucleico. Dicha homología puede existir a lo largo de una región de al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 30, por ejemplo, al menos aproximadamente 40, 60, 100, 200 o más nucleótidos contiguos (dependiendo de la longitud). Tal homología puede existir a lo largo de toda la longitud de la secuencia de polinucleótidos sin modificar.

Los métodos para medir la homología o identidad de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede usar para calcular la homología (p. ej., usado en su configuración predeterminada) (Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395).

Los algoritmos PILEUP y BLAST también se pueden usar para calcular la homología o alinear secuencias (normalmente en su configuración predeterminada), por ejemplo, como se describe en Altschul S.F. (1993) *J Mol Evol* 36: 290-300; Altschul, S, F y otros (1990) J Mol Biol 215:403-10.

El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coincidan o satisfagan cierto umbral de puntuación T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., véase antes). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que los contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada

secuencia tanto como se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulada. Las extensiones para los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor que aproximadamente 1, generalmente menor que aproximadamente 0.1, adecuadamente menor que aproximadamente 0.01 y, lo más adecuadamente, menor que aproximadamente 0.001. Por ejemplo, la probabilidad de suma más pequeña puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 - aproximadamente 0.001, a menudo de aproximadamente 0.01 - aproximadamente 0.001.

El homólogo puede diferir de una secuencia en el polinucleótido relevante en menos de aproximadamente 3, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (cada una de las cuales puede ser una sustitución, eliminación o inserción). Por ejemplo, el homólogo puede diferir en 3-50 mutaciones, a menudo 3-20 mutaciones. Estas mutaciones pueden medirse a lo largo de una región de al menos 30, por ejemplo, al menos aproximadamente 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos del homólogo.

Una secuencia variante puede variar de las secuencias específicas dadas en la lista de secuencias en virtud de la redundancia en el código genético. El código de ADN tiene 4 restos de ácidos nucleicos primarios (A, T, C y G) y los utiliza para "deletrear" codones de tres letras que representan los aminoácidos de las proteínas codificadas en los genes de un organismo. La secuencia lineal de codones a lo largo de la molécula de ADN se traduce en la secuencia lineal de aminoácidos en la(s) proteína(s) codificada(s) por esos genes. El código está muy degenerado, con 61 codones que codifican los 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan señales de "parada". Por lo tanto, la mayoría de los aminoácidos están codificados por más de un codón; de hecho, varios están codificados por cuatro o más codones diferentes. Por lo tanto, un polinucleótido variante puede codificar la misma secuencia de polipéptido que otro polinucleótido, pero puede tener una secuencia de ácido nucleico diferente debido al uso de diferentes codones para codificar los mismos aminoácidos.

La secuencia de ADN puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo pueden obtenerse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se pueden sintetizar según se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o basándose en las secuencias de aminoácidos correspondientes.

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

La presente descripción también proporciona una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo. Puede usarse cualquier sistema de célula hospedante/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli,* y otros sistemas microbianos o también se pueden usar sistemas de expresión de células hospedantes eucariotas, por ejemplo de mamíferos. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen células CHO, mieloma o hibridoma.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente descripción, que comprende cultivar una célula hospedante que contiene un vector de la presente descripción en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente descripción, y aislar (recoger) la molécula de anticuerpo.

Los anticuerpos pueden unirse al mismo epítopo o competir por la unión con el anticuerpo VHH6 de la descripción. Los restos en el epítopo para VHH6 se identifican en los Ejemplos y Figuras. En particular, el epítopo para VHH6 comprende los restos D221, S228, R231 y H256 de gp80 y los restos S22, E23, E80 y Q183 de IL-6. Un anticuerpo puede unirse a un epítopo que comprende al menos uno de estos restos de gp80 y al menos uno de los restos de IL-6, preferiblemente al menos dos o al menos tres restos tanto de IL-6 como de gp80. Lo más preferiblemente, un anticuerpo de la descripción se une a un epítopo con todos los restos anteriores. Los epítopos para los anticuerpos pueden determinarse mediante análisis de cristalografía de rayos X. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente

descripción pueden evaluarse a través de un análisis de cristalografía de rayos X del anticuerpo unido al complejo IL-6/gp80. Los epítopos pueden, en particular, identificarse de esta manera determinando restos en IL-6/gp80 en el espacio de 4 Å de un resto de parátopo del anticuerpo.

Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo de referencia, o si compite por unirse a él, usando otros métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de ensayo se une al mismo epítopo que un anticuerpo de referencia de la descripción, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína o péptido en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de ensayo para unirse a la proteína o el péptido. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse a la proteína o péptido después de la unión por saturación con el anticuerpo de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de ensayo se une a un epítopo diferente que el anticuerpo de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de ensayo no puede unirse a la proteína o al péptido después de la unión por saturación con el anticuerpo de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo puede unirse al mismo epítopo que el epítopo unido por el anticuerpo de referencia de la descripción.

Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones. En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína/péptido en condiciones de saturación, seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de ensayo a la molécula de proteína/péptido. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de ensayo se una a la proteína/péptido en condiciones de saturación, seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la proteína/péptido. Si, en ambas orientaciones, solo el primer anticuerpo (saturación) es capaz de unirse a la proteína/péptido, entonces se concluye que el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a la proteína/péptido. Como apreciará el experto en la técnica, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia puede no unirse necesariamente al epítopo idéntico que el anticuerpo de referencia, si no que puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia al unirse a un epítopo que solapa o adyacente.

Dos anticuerpos se unen al mismo epítopo o al que solapa si cada uno inhibe (bloquea) de forma competitiva la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos 50%, 75%, 90% o incluso 99%, según se mide en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans et al., *Cancer Res*., 1990:50:1495-1502). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos que solapan si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

A continuación, puede llevarse a cabo una experimentación de rutina adicional (p. ej., mutación de péptido y análisis de unión) para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de ensayo se debe de hecho a la unión al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo se pueden realizar usando ELISA, RIA, resonancia de plasmón de superficie, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión de anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica.

Para cribar los anticuerpos que se unen a un epítopo particular, se puede llevar a cabo un ensayo de bloqueo cruzado de rutina como el descrito en *Antibodies*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Otros métodos incluyen mutantes por barrido de alanina, transferencias de péptidos (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), o análisis de escisión de péptidos. Además, se pueden emplear métodos tales como la escisión de epítopos, extracción de epítopos y modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Dichos métodos son bien conocidos en la técnica.

La unión al mismo epítopo o la unión competitiva también podría determinarse usando cristalografía de rayos X como se mencionó anteriormente.

Una proteína de unión de la descripción no tiene que ser un anticuerpo. Una proteína de unión podría ser cualquier tipo de proteína que pueda seleccionarse para unirse a la interacción proteína:proteína transitoria. Por ejemplo, la proteína de unión puede comprender dominios de repeticiones de anquirina.

Uso de una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria en el suministro de carga a una célula diana

La descripción también proporciona el uso de una proteína de unión como se describe anteriormente en el suministro de carga a una célula diana. La carga puede ser un compuesto de diagnóstico o terapéutico. La célula diana puede ser cualquier tipo de célula apropiado, pero normalmente es una célula cancerosa.

Los ejemplos de células cancerosas incluyen células de un tumor hematológico, tal como células seleccionadas del grupo que consiste en células de leucemia mieloide aguda, células de leucemia mieloide crónica, células de leucemia linfática aguda, células de leucemia linfática crónica, células de linfoma, células del síndrome mieloproliferativo, células de mielodisplasia, células de mieloma, células de un tumor no hematológico, tales como una célula seleccionada del grupo que consiste en células de carcinoma de células renales, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de pulmón, células de mesotelioma, células de cáncer de próstata, células de cáncer de cerebro, células de cáncer de huesos, células de sarcoma, células de cáncer de tejido blando, células de cáncer de ovario, células de cáncer de

cuello uterino, células de cáncer de mama, células de cáncer de endometrio, células de cáncer de útero, células de tumor de células germinales, células de cáncer anal, células de carcinoma rectal, células de carcinoma de colon, células de carcinoma de intestino delgado, células de carcinoma gástrico, células tumorales de estroma gastrointestinal, células de carcinoma de hígado, células de carcinoma de páncreas, células de carcinoma de vías biliares, células de carcinoma de vesícula biliar, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer de hipofaringe, células de cáncer de laringe, células de un cáncer de esófago, células de cáncer de piel, preferiblemente células de melanoma, células de un cáncer infantil, células de un tumor endocrino, células de un tumor carcinoide, células de timoma, células de cáncer de tiroides, células de un tumor de células de los islotes, células de un tumor de células suprarrenales, células de un tumor neuroendocrino y células de un cáncer primario desconocido (cáncer de origen primario desconocido).

Como se discutió anteriormente, la presente descripción proporciona un medio más específico para dirigir carga a una célula. Este método implica el reconocimiento de dos moléculas diana diferentes en la célula diana y después el suministro de la carga a través de la proteína de unión descrita en el presente documento. Las moléculas diana pueden ser, por ejemplo, antígenos o receptores, tales como antígenos tumorales en una célula tumoral. El término "antígeno" generalmente abarca moléculas capaces de ser reconocidas por un anticuerpo. El término "antígeno" puede abarcar receptores. Sin embargo, los receptores también se analizan específicamente en el presente documento, ya que la porción dirigida de la molécula dirigida puede ser un ligando para un receptor (en lugar de un anticuerpo).

La combinación de ambos antígenos (o receptores) solo se puede encontrar en la diana (p. ej., células tumorales) o expresar en células que no son células diana (es decir, células no cancerosas) en una medida insignificante. Ambos antígenos tumorales pueden ser específicos para células cancerosas y para un cierto tipo de cáncer.

Se proporcionan emparejamientos de antígenos, por ejemplo, en el documento WO 2013/104804, tales como:

(i) uno de dichos antígenos es EpCAM y el otro es EGFR, HER2/neu, CD 10, VEGF-R o MDR;

(ii) uno de dichos antígenos es MCSP y el otro es melanoferrina o EpCAM;

(iii) uno de dichos antígenos es CA125 y el otro CD227

(iv) uno de dichos antígenos es CD56 y el otro es CD 140b o gangliósido GD3;

(v) uno de dichos antígenos es EGFR y el otro es HER2;

(vi) uno de dichos antígenos es PSMA y el otro es HER2;

(vii) uno de dichos antígenos es Sialyl Lewis y el otro es EGFR;

(viii) uno de dichos antígenos es CD44 y el otro es ESA, CD24, CD133, MDR o CD1 17;

(ix) uno de dichos antígenos es CD34 y el otro es CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD1 17, CD33 o CD15;

(x) uno de dichos antígenos es CD33 y el otro es CD 19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD117 o CD15;

(xi) uno de dichos antígenos es MUC1 y el otro es CD10, CEA o CD57;

(xii) uno de dichos antígenos es CD38 y el otro es CD 138;

(xiii) uno de dichos antígenos es CD 24 y el otro es CD29 o CD49f;

(xiv) uno de dichos antígenos es la anhidrasa carbónica IX y el otro es la acuaporina-2;

(xv) uno de dichos antígenos es HLA-A2 y el otro es EpCAM;

(xvi) uno de dichos antígenos es HLA-A2 y el otro es CD45;

(xvii) uno de dichos antígenos es HLA-A2 y el otro es EGFR;

(xviii) uno de dichos antígenos es HLA-A2 y el otro es Her2;

(xix) uno de dichos antígenos es HLA-A2 y el otro es CEA;

(xx) uno de dichos antígenos es EpCAM y el otro es CEA;

(xxi) uno de dichos antígenos es CD45 y el otro es CD 138;

(xxii) uno de dichos antígenos es EGFR y el otro es CEA;

(xxiii) uno de dichos antígenos es Her2 y el otro es CEA; o

(xxiv) uno de dichos antígenos es CD19 y el otro es un anticuerpo clonotípico en la superficie de una célula B.

Otros antígenos expresados en diferentes tipos de células son bien conocidos en la técnica y también podrían identificarse usando experimentación de rutina. Los ejemplos de marcadores para el estado maligno de una célula incluyen: E-cadherina para células epiteliales y células de carcinoma de mama de tipo ductal; Ca-125 para tumores malignos epiteloides y células de cáncer de ovario, células de adenocarcinoma y células de cáncer de mama; Her-2/neu para células de cáncer de mama; proteína de líquido de enfermedad quística macroscópica (proteína BRST-2) para células de cáncer de mama; BCA-225 (glucoproteína asociada al carcinoma de mama) para células de cáncer de pulmón y mama; CA 19-9 (antígeno carbohidrato 19-9) para células cancerosas de páncreas, vías biliares y tracto intestinal; CEA para células de cáncer colorrectal; CD117 (c-kit) para células de gist (tumor del estroma gastrointestinal) (y mieloides y mastocitos); CD30 para células Reed-Sternberg (y células T y células B activadas por i-1); antígeno epitelial (BER-EP4), antígeno epitelial de membrana y antígeno epitelial relacionado (MOC-31) para células de cáncer epitelial; receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER1) para células de varios tipos de cáncer; receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) alfa para células de varios tipos de cáncer; marcador asociado a melanoma/Mart 1/Melan-A para células de melanoma; CD133 para poblaciones de células madre cancerosas y otras; TAG 72 (gp 72 asociada a tumor) para células de adenocarcinoma.

Otros ejemplos de marcadores para un estado maligno de una célula o células incluyen: EpCAM, CD 19, HER-2, HER-3, HER-4, PSMA, MUC-1 (mucina), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B , MUC7, Lewis-Y, CD20, CD33, CD44v6, Wue-1, antígeno de células plasmáticas, IgE (unida a membrana), proteoglicano de sulfato de condroitina de melanoma (MCSP), STEAP, mesotelina, antígeno de células madre prostáticas (PSCA), sTn (antígeno Tn sialilado), FAP (antígeno de activación de fibroblastos), EGFRvIII, Iga, Ig, MT-MMP, antígeno Cora, EphA2, L6 y CO-29, CCR5, pHCG, gangliósido GD3, 9-0-acetil-GD3, GM2, Globo H, fucosil GM1, Poly SA, GD2, carboanhidrasa IX (MN/CA IX), Sonic Hedgehog (Shh), CCR8, precursor de TNF-alfa, antígeno A33, Ly-6, desmogleína 4, neoepítopo de E-cadherina, receptor de acetilcolina fetal, CD25, receptor tipo II de sustancia inhibidora mülleriana (MIS), endosialina, SAS, CD63, TF-antígeno, CD7, CD22, Iga(CD79a), Ig (CD79b), G250, gplOO, F19-antígeno y EphA2.

Los ejemplos de antígenos que son específicos para un determinado tipo de célula/linaje celular o para unos pocos tipos de células/linajes celulares (marcadores de tipo celular/marcadores de linaje celular) incluyen: CD45 para células hematopoyéticas; CD34 para células endoteliales, células madre y células estromales; CD33 para células mieloides; CD 138 para células plasmáticas y un subconjunto de células epiteliales; CD 15 para células epiteliales, mieloides y Reed-Sternberg; CD la para timocitos corticales y células de Langerhans; CD2 para células tímicas, células T y células citolíticas naturales (NK); CD3 para células T; CD4 para células T auxiliares; CD5 para células T, un subconjunto de células B y células de carcinoma tímico; CD8 para células T citotóxicas; CD20 para células B; CD23 para células B activadas; CD31 para células endoteliales; CD43 para células T, células mieloides, un subconjunto de células B, histiocitos y células plasmáticas; CD56 para células NK; CD57 para células neuroendocrinas y células NK; CD68 para macrófagos; CD79a para células B y células plasmáticas; CD 146 para el linaje de células endoteliales; proteínas tensioactivas para células pulmonares; sinaptofisina, CD56 o CD57 para células neuroendocrinas; receptor de acetilcolina nicotínico o quinasa específica de músculo (MUSK) para células musculares; canal de calcio regulado por voltaje (tipo P/Q) o canal de potasio regulado por voltaje (VGKC) o receptor de N-metil-D-aspartato (NMD A) para células musculares y neuronas; receptor de TSH (hormona estimulante de tiroides) para la glándula tiroidea; anfifisina para células musculares; HepPar-1 para hepatocitos; gangliósido GQ1B, GD3 o GM1 para células neuronales; y glicoforina-A para células del linaje de células eritropoyéticas.

Específicamente, la presente descripción proporciona un método para suministrar carga a una célula diana, que comprende:

(1) administrar dos moléculas dirigidas, en donde:

- la primera molécula dirigida comprende una primera parte dirigida que se une específicamente a una primera molécula diana en la célula diana y en donde la parte dirigida se une al primer componente proteína de una interacción proteína:proteína transitoria; y

- la segunda molécula dirigida comprende una segunda parte dirigida que se une específicamente a una segunda molécula diana en la célula diana y en donde la parte dirigida se une al segundo componente proteína de la interacción proteína:proteína transitoria;

(2) administrar una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por la interacción proteína:proteína transitoria, cuya proteína de unión está unida a la carga y en donde la proteína de unión es como se ha definido antes.

Este método se ejemplifica en la Figura 1.

La primera y segunda partes dirigidas son típicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (los fragmentos de anticuerpos se describen antes), que se unen específicamente a la primera y segunda moléculas diana en la célula diana. Las partes dirigidas también pueden ser ligandos donde las moléculas diana son receptores. La unión específica se ha escrito antes. Las partes dirigida pueden unirse a los componentes proteínas de la PPI por un medio apropiado, tal como una secuencia conectora. Los métodos para fusionar proteínas al mismo tiempo que se conserva la

funcionalidad son bien conocidos en la técnica.

La segunda etapa del método implica la administración de la proteína de unión que, como se ha descrito anteriormente, suele ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La carga se puede unir a la proteína de unión por cualquier medio apropiado. La carga puede ser un agente de diagnóstico o terapéutico. Por ejemplo, el compuesto terapéutico puede ser un radiomarcador (compuesto radiactivo) tal como ^{90}Y, ^{177}Lu, ^{131}I, ^{32}P, ^{10}B o ^{213}B. El compuesto terapéutico también puede ser una toxina, tal como factor de edema de *B. antracis*, factor letal de *B. antracis*, toxina iota de *C. perfringens*, toxina C2 de C. *botulinum*, ADP-ribosiltransferasa de C. difficile, fragmento A de la toxina diftérica de C. *difteria*, toxina shiga de *Burgholderia sp.* (subunidad A), toxina perfringolisina O pfoA de *Clostridium perfringens* cepa 13, cadena A de ricina, bouganina RIP de planta, ribonucleasa RNASE3 humana (familia RNasa A, 3) y endopeptidasa del factor letal del ántrax.

El agente terapéutico también podría ser cualquier fármaco o agente quimioterapéutico apropiado. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica.

El agente de diagnóstico también podría ser un compuesto radiactivo, tal como ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{82}Rb o ^{201}Tl. El agente de diagnóstico también podría ser un compuesto fluorescente, preferiblemente GFP, una variante de GFP o un compuesto fluorescente de molécula pequeña tal como FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), un colorante Alexa Fluor (tal como AlexaFluor488 o colorantes relacionados) o un colorante de cianina (tal como Cy3 (Indocarbocianina) o Cy5 (Indodicarbocianina) o colorantes relacionados). El agente de diagnóstico puede ser una molécula capaz de mediar bioluminiscencia, preferiblemente una molécula de luciferasa, más preferiblemente luciferasa de *Gaussia*.

Dependiendo del tipo de carga, el método descrito anteriormente puede tener varios propósitos diferentes. Por ejemplo, cuando la carga es un agente terapéutico, el método puede ser un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, p. ej., un método de tratamiento del cáncer. Cuando la carga es un agente de diagnóstico, el método podría ser un método de diagnóstico *in vivo*.

Preferiblemente, cuando se utiliza *in vivo,* la proteína de unión es Fab, scFV o VHH. Estos formatos dan como resultado una eliminación rápida de la carga ya que tales fragmentos pasan rápidamente a través del filtro renal. El pequeño tamaño de dichos fragmentos también significa que se produce una rápida penetración en el tejido.

También podría utilizarse el método *in vitro* cuando se suministra una carga que es un agente terapéutico o de diagnóstico.

El método descrito anteriormente proporciona una serie de ventajas frente a las técnicas conocidas. El uso de la proteína de unión proporciona una mayor especificidad que cuando se usa un anticuerpo biespecífico no modificado y evita la necesidad de modificar el anticuerpo biespecífico para que se dirija de manera efectiva solo a las células que expresan ambas moléculas diana, en lugar de una. El método descrito en el presente documento también es independiente de la molécula diana. Además, el método permite el ajuste fino de las diferentes etapas, p. ej., dependiendo de la afinidad de las moléculas dirigidas por sus moléculas diana, así como de la afinidad de la proteína de unión por la PPI transitoria.

Las pautas posológicas variarán dependiendo del sistema exacto que se va a utilizar, y el experto en la técnica las podría determinar fácilmente. El sistema debería permitir la acumulación de las moléculas dirigidas en los sitios deseados con eliminación sistémica en sitios que no son objetivo seguida de la administración secundaria de la proteína de unión unida a la carga. La proteína de unión se acumularía rápidamente en el sitio objetivo debido a su interacción con las moléculas dirigidas. Normalmente, la proteína de unión unida a la carga se administraría de 2 a 3 días después de la administración de las moléculas dirigidas. Sin embargo, el espaciamiento puede ser cualquier cosa desde horas (p. ej., 4, 5, 6 horas) hasta 3, 4 o 5 días.

Cuando la PPI transitoria es la interacción IL-6/gp80, sería apropiado usar un sistema mutado donde las interacciones con gp130 se atenúan. Esto podría lograrse fácilmente mediante la mutación de restos en la interfaz del sitio 2 en 11-6 o gp80. Esto minimizaría cualquier señalización endógena.

En los ejemplos se describe un método para ensayar si una proteína de unión puede entrecruzar fusiones de dos anticuerpos (y por lo tanto sus antígenos). Un ensayo de destrucción de células cancerosas también sería apropiado para ensayar un sistema donde se va a administrar un agente quimioterapéutico. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica.

Activación de un efecto biológico utilizando una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria

La descripción también proporciona el uso de una proteína de unión como se define anteriormente para activar un efecto biológico. El efecto biológico puede activarse únicamente mediante la administración de la proteína de unión a un sistema biológico. En otras palabras, la proteína de unión por sí sola puede actuar como un interruptor molecular para activar el efecto biológico asociado con la PPI transitoria. Aquí, cuando están presentes uno o dos del primer componente proteína de la PPI transitoria, el segundo componente proteína de la PPI transitoria y la proteína de unión, no se observa el efecto biológico. Sin embargo, cuando los tres del primer y segundo componentes proteínas de la

PPI transitoria y la proteína de unión están presentes, y el primer y segundo componentes proteínas están colocalizados, la PPI se estabiliza y se induce el efecto biológico.

Tal sistema podría tener tanto usos *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, como se analiza más adelante, la estabilización de la interacción IL-6/gp80 se puede utilizar para aumentar la fosforilación de STAT3 (y los efectos posteriores asociados). *In vivo,* dicho sistema tiene utilidad, por ejemplo, en la regeneración del hígado después de una lesión (véase más abajo).

La presente descripción también proporciona un segundo método de interruptor molecular, donde la proteína de unión se usa para activar un efecto biológico distinto de la interacción proteína:proteína transitoria.

En particular, la descripción proporciona un método para activar un efecto biológico, que comprende:

(1) administrar dos moléculas dirigidas, en donde:

- la primera molécula dirigida comprende una primera parte dirigida que se une específicamente a una primera molécula diana en la célula diana y en donde la parte dirigida se une al primer componente proteína de una interacción proteína:proteína transitoria; y

- la segunda molécula dirigida comprende una segunda parte dirigida que se une específicamente a una segunda molécula diana en la célula diana y en donde la parte dirigida se une al segundo componente proteína de la interacción proteína:proteína transitoria; y

(2) administrar una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por la interacción proteína:proteína transitoria, en donde la proteína de unión es como se definió anteriormente y en donde la administración de la proteína de unión activa el efecto biológico.

Este método de "interruptor molecular" se ilustra en la Figura 2.

El efecto biológico no está limitado y podría ser cualquier efecto que se consiga mediante el entrecruzamiento de dos moléculas diana. En una posición "apagado", con solo una o dos de las moléculas diana presentes (y, en consecuencia, solo una de las dos moléculas dirigidas uniéndose a la molécula diana), no se observa el efecto biológico. Sin embargo, en una posición "encendido", donde las dos moléculas diana están presentes y colocalizadas, y las dos moléculas dirigidas están unidas, la adición de la proteína de unión provoca el entrecruzamiento y la activación del efecto biológico.

Como se discutió anteriormente, las partes dirigidas son típicamente anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) o ligandos, que pueden unirse al primer y segundo componentes de la PPI por cualquier medio conocido, tal como usando una secuencia conectora. Las moléculas diana pueden ser antígenos o receptores.

El método anterior se puede utilizar como un interruptor molecular *in vitro* o *in vivo.* Por ejemplo, la activación de un efecto biológico *in vivo* puede usarse en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección.

Como se discutió anteriormente, cuando la PPI transitoria es la interacción IL-6/gp80, sería apropiado usar un sistema mutado donde estén atenuadas las interacciones con gp130.

El ejemplo 2 proporciona un ejemplo general de cómo se puede ensayar el direccionamiento biespecífico que solo da función cuando están presentes dos marcadores moleculares.

La presente descripción proporciona además el uso de una proteína de unión como se define anteriormente para alterar un efecto biológico. En particular, dicho efecto biológico es una respuesta de señalización o una respuesta biológica. Se demuestra que la amplificación de la señalización mediante la estabilización de una interacción transitoria usando VHH6 mejora la señalización, en particular en la Figura 11. La Figura 16 también demuestra que dichas proteínas de unión modifican el efecto biológico.

La presente descripción proporciona un método para alterar un efecto biológico, que comprende:

(1) administrar dos moléculas dirigidas, en donde:

- la primera molécula dirigida comprende una primera parte dirigida que se une específicamente a una primera molécula diana en la célula diana y en donde la parte dirigida se une al primer componente proteína de una interacción proteína:proteína transitoria; y

- la segunda molécula dirigida comprende una segunda parte dirigida que se une específicamente a una segunda molécula diana en la célula diana y en donde la parte dirigida se une al segundo componente proteína de la interacción proteína:proteína transitoria; y

(2) administrar una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por la interacción proteína:proteína transitoria, en donde la proteína de unión es como se definió anteriormente y en donde la

administración de la proteína de unión altera el efecto biológico.

Más específicamente, el método proporcionado anteriormente se usa para amplificar, disminuir o modificar una respuesta biológica. Más particularmente, dicho método se usa para activar/desactivar un efecto biológico.

Uso de una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria en el entrecruzamiento de células diana

La descripción también proporciona el uso de una proteína de unión como se define anteriormente en el entrecruzamiento de células diana. En particular, la descripción proporciona un método para entrecruzar dos células diana utilizando una proteína de unión, en donde la primera célula diana expresa una primera molécula diana y la segunda célula diana expresa una segunda molécula diana, y en donde el método comprende:

(1) administrar dos moléculas dirigidas, en donde:

- la primera molécula dirigida comprende una primera parte dirigida que se une específicamente a la primera molécula diana en la primera célula diana y en donde la parte dirigida se une al primer componente proteína de una interacción proteína:proteína transitoria; y

- la segunda molécula dirigida comprende una segunda parte dirigida que se une específicamente a la segunda molécula diana en la segunda célula diana y en donde la parte dirigida se une al segundo componente proteína de la interacción proteína:proteína transitoria; y

(2) administrar una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por la interacción proteína:proteína transitoria como se define anteriormente.

Este método se ilustra en la Figura 3.

La descripción también proporciona un método para entrecruzar dos células diana, en donde la primera célula diana expresa una primera y una segunda molécula diana y la segunda célula diana expresa una tercera molécula diana, y en donde el método comprende:

(1) administrar dos moléculas dirigidas, en donde:

- la primera molécula dirigida comprende una primera parte dirigida que se une específicamente a la primera molécula diana en la primera célula diana y en donde la parte dirigida se une al primer componente proteína de una interacción proteína:proteína transitoria; y

- la segunda molécula dirigida comprende una segunda parte dirigida que se une específicamente a la segunda molécula diana en la primera célula diana y en donde la parte dirigida se une al segundo componente proteína de la interacción proteína:proteína transitoria; y

(2) administrar una tercera molécula dirigida que comprende una tercera parte dirigida que se une específicamente a la tercera molécula diana en la segunda célula diana, en donde la parte dirigida se une a una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por la interacción proteína:proteína transitoria y en donde la proteína de unión es como se define anteriormente.

Este método se ilustra en la Figura 4.

Además, la descripción proporciona un método para entrecruzar dos células diana, en donde la primera célula diana expresa una primera y una segunda molécula diana y en donde la segunda célula diana está modificada para presentar una proteína de unión en su superficie, y en donde el método comprende administrar dos moléculas dirigidas, donde

- la primera molécula dirigida comprende una primera parte dirigida que se une específicamente a la primera molécula diana en la primera célula diana y en donde la parte dirigida se une al primer componente proteína de una interacción proteína:proteína transitoria; y

- la segunda molécula dirigida comprende una segunda parte dirigida que se une específicamente a la segunda molécula diana en la primera célula diana y en donde la parte dirigida se une al segundo componente proteína de la interacción proteína:proteína transitoria;

en donde la proteína de unión es como se define anteriormente.

Este método se ilustra en la Figura 5.

En todos estos métodos, la primera, segunda y tercera partes dirigidas (si están presentes) pueden ser anticuerpos o fragmentos de los mismos, o ligandos para las moléculas diana. La primera, segunda y tercera moléculas diana (si están presentes) pueden ser antígenos o receptores.

La primera o segunda célula diana no está particularmente limitada, pero podría ser una célula cancerosa, que se

puede entrecruzar con una célula efectora, tal como una célula T. Las moléculas diana en las células cancerosas y las células T serían bien conocidas por el experto en la técnica. Los antígenos de cáncer de ejemplo se han descrito anteriormente. Por ejemplo, la molécula diana en una célula T podría ser CD3, particularmente CD3ε. La célula diana también podría ser una célula NK (citolítica natural), donde la molécula diana puede ser NKp46. Una vez más, el método podría ser un método *in vivo*, de modo que el método es un método terapéutico o profiláctico. El método también podría ser un método *in vitro*.

El método se puede ajustar a través de las diferentes cinéticas de unión de la proteína de unión y de las moléculas diana.

Usos médicos

Las proteínas de unión de la presente descripción pueden tener aplicaciones médicas cuando se administran sin moléculas dirigidas. Por ejemplo, las proteínas de unión podrían usarse para estabilizar la PPI transitoria *in vivo* y por lo tanto inducir un efecto terapéutico o profiláctico (véase antes). Por lo tanto, la descripción proporciona un método de tratamiento del cuerpo humano o animal que comprende la administración de una proteína de unión como se describe anteriormente. La proteína de unión también podría usarse para estabilizar una PPI transitoria, antes de la administración del complejo que comprende la PPI con la proteína de unión.

Como se describe en los ejemplos de la presente solicitud, se mostró que VHH6 aumenta significativamente la señalización a través de IL-6/gp80/gp130, que culmina en la fosforilación de STAT3. Las moléculas STAT fosforiladas se translocan al núcleo, donde se activa la transcripción de genes implicados en la respuesta a la IL-6. De hecho, se mostró que VHH6 afecta a la transcripción de genes en la ruta de la IL-6. Por lo tanto, parece que VHH6 modula estados patológicos y, por lo tanto, ofrece potencial para comprender mejor el papel de la IL-6, p. ej. en la inflamación.

VHH6 (o, de hecho, otras proteínas de unión específicas para un epítopo de conexión creado por la interacción IL-6/gp80) también podría usarse de forma terapéutica donde la IL-6 tiene un papel como factor de crecimiento, tal como en la regeneración de tejidos (particularmente después de una lesión en la regeneración del hígado). Por ejemplo, la proteína de unión podría usarse como tratamiento para promover la regeneración del hígado y restablecer la función del hígado. La lesión hepática puede ser causada por una sustancia tóxica (p. ej., hepatopatía inducida por fármacos o hepatitis alcohólica), traumatismo mecánico, tumor maligno, una enfermedad autoinmunitaria o por un patógeno (p. ej., virus de la hepatitis). La proteína de unión de la descripción se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, que podría determinar el experto en la técnica. La proteína de unión de la descripción se administra típicamente en una composición farmacéutica como se describe a continuación.

Dicha proteína de unión también podría usarse *in vitro* en la activación de células progenitoras similares a hepatocitos y en la expansión de células progenitoras hematopoyéticas.

Galun (2013) *Methods in Molecular Biology*, 982, 59-77 considera la función regeneradora de la IL-6. Wuestefeld et al. (2003) *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 11281-11288 considera la función de la ruta de IL-6/gp80 en la regeneración del hígado, Best et al. (2010) *Experimental and Molecular Pathology*, 88, 7-14 analiza las células progenitoras similares a los hepatocitos en la lesión hepática de rata y Fischer (1997) *Nature Biotechnology*, 15, 142-145 considera la expansión de progenitores hematopoyéticos. También se ha descrito el uso de IL-6/gp80 unido covalentemente para la regeneración de tejidos (particularmente hígado) en el documento WO 99/62534.

Uso de una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria en la regeneración tisular.

Es importante destacar que la presente descripción permite dirigir efectos biológicos a los sitios de los dos objetivos descritos anteriormente para evitar efectos sistémicos que podrían ocurrir si uno de estos objetivos se administrara sistémicamente. La administración sistémica de IL-6 podría causar una inflamación amplia que sería indeseable (Gabay et al. *Arthritis Res Ther* 8, supl. 2: T3 (2006)). Usando las proteínas de unión descritas en el presente documento, los efectos podrían restringirse al sitio de la lesión hepática donde se liberan gp80 e IL-6. Las proteínas de unión descritas en el presente documento podrían usarse para mejorar la regeneración del nervio óptico mediante la promoción de la señalización de IL-6 (Fischer, *Eye* 31, 173-178 (2017)), en la regeneración del tejido de las vías respiratorias (Tadokoro et al. *PNAS* 111(35), E3641-E3649 (2014)) o más ampliamente en otras áreas de la medicina regenerativa.

En particular, la presente descripción proporciona un método para amplificar o aumentar la señalización de IL-6/gp80, que comprende administrar una proteína de unión o descrita en el presente documento. Dicho método se podría poner en práctica como un método *in vitro* o un método *in vivo*.

En particular, la presente descripción proporciona un método de regeneración tisular, que comprende administrar una proteína de unión descrita en el presente documento. En una realización particular de la descripción dicho método es un método *in vitro*. En otra realización más de la descripción, dicho método es un método *in vivo*.

En particular, la presente descripción proporciona un método de regeneración tisular, que comprende administrar una proteína de unión descrita en el presente documento. Dicha proteína podría administrarse en una composición farmacéutica como se describe más adelante en el presente documento.

La presente descripción proporciona además el uso de la proteína de unión de la descripción para la regeneración de tejidos.

En una realización particular de la descripción, dicha proteína es una proteína específica para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria, en donde dicha interacción proteína:proteína es la interacción IL-6/gp80. Más específicamente, dicha proteína amplifica o aumenta la señalización de IL-6/gp80 al estabilizar una interacción transitoria.

Más particularmente, dicha regeneración tisular es regeneración hepática. En otra realización de la descripción, dicha regeneración de tejidos es regeneración de nervios. En otra realización más de la descripción, dicha regeneración de tejidos es la regeneración de las vías respiratorias.

Más específicamente, dicha proteína de unión es el anticuerpo VHH6. Más particularmente, dicha proteína de unión es un anticuerpo VHH6 humanizado. Más específicamente, dicho anticuerpo VHH6 humanizado es el anticuerpo VHH6 humanizado como se describe en el presente documento.

Composición farmacéutica

Una proteína de unión descrita en el presente documento se puede proporcionar en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica normalmente será estéril y típicamente incluirá un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo puede ser adecuado para uso parenteral, p. ej., intravenoso, intramuscular, intradérmico, intraocular, intraperitoneal, subcutáneo, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión. Alternativamente, el vehículo puede ser adecuado para la administración no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosa. El vehículo puede ser adecuado para la administración oral. Dependiendo de la vía de administración, el modulador se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado. Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden vehículos acuosos o diluyentes. Los ejemplos de vehículos acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, agua tamponada y solución salina. Los ejemplos de otros vehículos incluyen etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. En muchos casos, será deseable incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender principios activos adicionales.

También están dentro del alcance de la presente descripción los kits que comprenden las proteínas de unión de la descripción y las instrucciones de uso.

Las proteínas de unión descritas en el presente documento o las formulaciones o composiciones de las mismas pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

En aplicaciones terapéuticas, los compuestos se administran a un sujeto que ya padece un trastorno o afección como se ha descrito antes, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la afección o uno o más de sus síntomas. Dicho tratamiento terapéutico puede dar como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad o un aumento en la frecuencia o duración de los períodos sin síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz".

En aplicaciones profilácticas, las formulaciones se administran a un sujeto en riesgo de sufrir un trastorno o afección como se describe anteriormente, en una cantidad suficiente para prevenir o reducir los efectos posteriores de la afección o uno o más de sus síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad profilácticamente efectiva". Las cantidades efectivas para cada finalidad dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y estado general del sujeto.

Un sujeto para la administración puede ser un ser humano o un animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, p.ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. La administración a seres humanos es típica.

Una composición farmacéutica se puede administrar a través de una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los ejemplos de vías de administración para compuestos o composiciones farmacéuticas incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraocular, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión. La frase "administración parental" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección. Alternativamente, el compuesto o la composición farmacéutica se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosa. La composición farmacéutica puede ser para administración oral.

Un médico experto puede determinar una dosis adecuada de la composición farmacéutica. Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variar para así obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos , compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Una dosis adecuada puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0.01 µg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal, típicamente de aproximadamente 0.1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, del paciente para tratar. Por ejemplo, una dosis adecuada puede ser de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día o de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por día.

Los pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una sola dosis, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La forma farmacéutica unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La administración puede ser en dosis únicas o múltiples. Pueden administrarse dosis múltiples por la misma o diferentes vías y en el mismo lugar o diferentes lugares. Alternativamente, las dosis pueden ser mediante una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia pueden variar según la semivida del antagonista en el paciente y la duración del tratamiento deseado.

Como se mencionó anteriormente, la composición farmacéutica se puede coadministrar con uno u más de otros agentes terapéuticos.

La administración combinada de dos o más agentes se puede lograr de varias formas diferentes. Ambos pueden administrarse juntos en una sola composición o pueden administrarse en composiciones separadas como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, uno puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que el otro.

Método para producir un anticuerpo específico para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria

La presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo específico para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria. El método implica inmunizar a un animal con una proteína de fusión del complejo de la PPI estabilizado. Los animales adecuados se han descrito anteriormente, pero pueden ser útiles los camellos con el fin de generar anticuerpos VHH.

Con respecto a la proteína de fusión, por ejemplo, uno de los componentes de proteína de la PPI puede fusionarse directamente en el extremo (p. ej., el extremo C) de la otra proteína como se describe en los ejemplos para la generación de VHH6. Los métodos para fusionar proteínas juntas son bien conocidos en la técnica.

El método implica después seleccionar un anticuerpo que interaccione con el complejo de la PPI pero no con cada componente individual de la PPI en ausencia del otro. Los métodos para determinar si un anticuerpo interacciona con el complejo de la PPI, pero no con cada componente individual, se han descrito antes e incluyen ELISA, HLPC, termoforesis a microescala, Octet (interferometría de biocapa) y resonancia de plasmón de superficie (típicamente a 25°C). En la presente invención, la proteína de unión puede mostrar una unión indetectable a cada componente individual de la PPI usando una cualquiera, preferiblemente múltiples, más preferiblemente todas las técnicas

anteriores. Como se ha descrito antes, la proteína de unión puede mostrar en algunos casos un nivel muy bajo de unión a las proteínas individuales de la PPI, pero no lo suficiente como para limitar la utilidad de la proteína de unión.

El método implica después determinar que el anticuerpo estabiliza la interacción proteína:proteína. Los métodos y valores representativos para la estabilización de la PPI se han descrito antes.

El método, por ejemplo, también puede utilizar técnicas adicionales, tales como la cristalografía de rayos X, para confirmar la naturaleza de la conexión de la proteína de unión. Los epítopos de conexión se han descrito antes.

Uso de una proteína de unión específica para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria en el cribado de una sustancia que modula la señalización a través de una interacción proteína:proteína

La descripción proporciona además el uso de una proteína de unión de la descripción en el cribado de sustancias que modulan la señalización a través de una PPI transitoria. La sustancia puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un péptido o incluso un anticuerpo. La sustancia típicamente es un inhibidor, es decir, una sustancia que reduce la señalización a través de la PPI transitoria. En otras palabras, la proteína de unión puede usarse en el descubrimiento de fármacos asistido por estructura. Tal análisis puede ser computacional.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Usando la interacción entre IL-6 y gp80 como un ejemplo bien conocido de una PPI, los autores de la presente invención han producido y caracterizado VHH6, un prototipo de anticuerpo de fijación (de conexión). VHH6 reconoce específicamente un epítopo que se extiende por la conexión entre IL-6 y gp80, fijándolos juntos en una unidad funcional estable. Dicho anticuerpo encuentra uso en una serie de aplicaciones diferentes, incluida el direccionamiento específico de antígenos en células cancerosas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción y ensayo de VHH6

Materiales y Métodos - Producción de anticuerpos

Producción y purificación de proteínas: Con la excepción de HyperIL-6 Humana (Fischer, M. et al. I. *Nature biotechnology* 15, 142-145 (1997)), todas las proteínas (FusionIL-6, gp80V4, gp80-hscFc, IL-6 e IL-6S21) se diseñaron internamente. FusionIL-6 es una versión modificada de HyperIL-6 donde se han eliminado todos los restos conectores no naturales, IL6 (V30-M212) se fusionó directamente en el extremo C de gp80 al final del dominio 3 (S320). Además, dos cisteínas no emparejadas se mutaron a alanina (C211A, C277A). Para aumentar el éxito en la cristalización, se utilizó una forma modificada de gp80 (gp80V4). En esta construcción, los 14aa N-terminales del dominio 1 de gp80 (L20-G33) se fusionaron con el extremo N del dominio 2 de gp80 utilizando un conector corto. La cisteína (C25) en el fragmento del dominio 1 forma un enlace disulfuro con la cisteína 193 en el dominio 2 estabilizando la proteína. Además, gp80V4 también tiene las cisteínas C211 y C277 no emparejadas mutadas a alanina.

Todas esas proteínas se produjeron internamente. Para construcciones, vectores y sistemas celulares utilizados para la producción de proteínas, véase la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Construcciones utilizadas en la producción de proteínas

Construcción	Hospedante de expresión	Promotor	Marcador de afinidad	Proteína expresada
pNAFL-8His-fusionIL-6(gp80D123)	CHO	CMV	8His	gp80(L20-S320)(C211A, C277A)-IL-6(V30-M212)
pNAFL-gP80D123-hscFc	CHO	CMV	Fragmento Fc de IgG humana monocatenario	gp80(M1-P322)(C211A, C277A)-hscFc
pNAFL-8His-gp80delta1,2,3 V4	CHO	CMV	8His	gp80(L20-G33-AGAG conector-D111-P322
pTrx-6His-hIL-6	*E. coli*	T7	Tiorredoxina-6His	(C211A,C277A) Trx-6His-IL-6(A28-M212)
pTrx-6His-IL-6(S21)	*E. coli*	T7	Tiorredoxina-6His	Trx-6His-IL-6 (S49-M212)
pIMMs-6His-VHH6	Expi-HEK	CMV	6His	VHH6-6His

La numeración para gp80 se basa en la referencia Uniprot P08887.

Las proteínas utilizadas para cristalografía y HDX-MS se produjeron en células Expi-HEK o CHO (Gibco, Thermo Fisher Scientific) en medios que contenían kifunensina (GlycoSyn). La IL-6 se produjo en E.coli. Para experimentos *in vitro*, IL-6, gp80 se adquirieron de R&D Systems. Para experimentos de SPR, gp130 se adquirió de R&D Systems.

Purificación con Ni: El líquido sobrenadante clarificado se pasó a través de un filtro de 0.22 µm y se cargó en una columna Ni Excel de 1 ml/5 ml (GE Healthcare) preequilibrada en PBS (pH 7.4) que contenía imidazol 20 mM. La proteína unida se eluyó con PBS (pH 7.4) que contenía imidazol 250 mM. Las fracciones que contenían la proteína de interés evaluadas mediante electroforesis en gel Bis/Tris NuPage al 4-12% (Life Technologies, Gibco, Thermo Fisher Scientific) se dializaron para eliminar el imidazol y se trataron con proteasa TEV en una proporción de 1 mg por 100 mg de proteína. Después de la incubación durante la noche a 4°C, la muestra se pasó por una columna de Ni Excel una segunda vez, eliminando la proteína no escindida y la proteasa TEV marcada con His, lo que dio como resultado una proteína escindida pura en el flujo de la columna.

Purificación de proteínas Fc marcadas: El líquido sobrenadante clarificado se pasó a través de un filtro de 0.22 µm y se cargó en una columna Mab Selectsure de 1 ml/5 ml (GE Healthcare) preequilibrada en PBS (pH 7.4). Si la proteína era Fc-marcado de ratón, se añadía NaCl 0.5 M al líquido sobrenadante para facilitar la unión. Luego se eluyó la proteína con un gradiente de pH de fosfato/citrato utilizando Na_2HPO_4 0.15 M a pH 9 y citrato de sodio 0.1 mM a pH 2. Las proteínas se eluyeron a aproximadamente pH 3.5 y se neutralizaron inmediatamente usando Tris 2 M a pH 8.

Las proteínas TEV-HuFc marcadas se eluyeron añadiendo proteasa TEV directamente a las perlas Mab Selectsure con 100 µg de TEV por ml de perlas e incubando en PBS a 4°C durante la noche. A continuación, las perlas se retiraron por centrifugación para dejar la proteína escindida sin marcar.

Filtración en geles: Las proteínas se concentraron utilizando tubos Centricon (Merck Millipore) y se cargaron en una columna de filtración de gel S75 26/60 (GE Healthcare) preequilibrada en PBS. Las fracciones de los picos se agruparon y se concentraron en tubos Centricon (Merck Millipore).

Campaña de descubrimiento de anticuerpos: Se inmunizaron dos camellos por vía subcutánea a lo largo de un período de tres meses con HyperIL-621, aumentando la dosis de 3 µg hasta un máximo de 1 mg en incrementos de medio logaritmo, en el Laboratorio Central de Investigación Veterinaria (CVRL) en Dubái, de acuerdo con un protocolo humanitario aprobado por la Dirección Científica del CVRL. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices/regulaciones pertinentes y fueron aprobados por la Dirección Científica del CVRL. La inmunización inicial se llevó a cabo con adyuvantes completos de Freund, mientras que los refuerzos posteriores utilizaron adyuvantes incompletos de Freund. Se recogieron muestras de suero de 3 ml a las 8, 10, 12 y 18 semanas después de la inmunización inicial para controlar la respuesta inmunitaria; a las 19 semanas, se recogieron 200 ml de sangre heparinizada y se aislaron y congelaron las PBMC. Los VHH de un solo dominio se generaron a partir de las PBMC congeladas de animales inmunizados mediante la clonación de genes de región variable de células B aisladas utilizando la plataforma de descubrimiento de anticuerpos descrita en Tickle, S. et al.. *JALA* 14, 303-307 (2009) y Lightwood, D. et al. *Journal of molecular biology* 425, 577-593 (2013).. Los VHH se clonaron posteriormente en el vector pIMM con el marcador TEV-6His secuencia abajo del fragmento de VHH para la expresión en mamíferos (Hancock, L.M. "A study of camelid antibodies reveal structural features of a cytokine". Tesis doctoral Universidad de Londres (2011)).

Materiales y métodos - Ensayos preliminares de cribado

ELISA - La IL-6, gp80 y FusionIL-6 utilizados en ELISA para recubrir las placas se diluyeron a una concentración final de 2 mg/ml en tampón de carbonato (Na_2CO_3 al 0.16% y $NaHCO_3$ al 0.3% en H_2O). Las placas recubiertas se incubaron a 4°C durante la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces en PBST, se bloquearon en PBS/BSA al 5% durante 2 h a TA y se lavaron nuevamente dos veces en PBST. Para el cribado preliminar, se añadió líquido sobrenadante de células HEK o VHH purificados. Se añadió anticuerpo anti-HRP de llama o anti-His-HRP durante 1 h a TA. Posteriormente, las placas se lavaron dos veces con PBST y se revelaron con sustrato TMB. La reacción se detuvo por adición de NaF. Las placas se leyeron a 650 nm con una longitud de onda de referencia de 450 nm (espectrofotómetro de microplacas Biotek PowerWave HT). En otros experimentos, se recubrió la placa con IL-6 durante la noche; se añadió VHH6 solo o con gp80-hscFc. Como alternativa, se recubrió la placa con gp80-hscFc durante la noche, se añadió VHH6 solo o con IL-6. Se usaron anticuerpos anti-HRP de llama (Bethyl Laboratories), anti-Fc-HRP humano (Jackson Lab, EE. UU.) o anticuerpos anti-His-HRP (Qiagen) para revelar la placa.

HPLC - Las soluciones de VHH6, gp80 e IL-6 solas o en combinación se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna HiLoad 16/60, Superdex G3000 (GE Healthcare) equilibrada con NaCl 50 mM, Tris 25 mM, glicerol al 5% (v/v) usando una columna Agilent 1100 Series (GE Healthcare).

MST - La termoforesis a microescala (MST) está relacionada con el movimiento de partículas sometidas a un gradiente de temperatura. Cuando se aplica un gradiente de temperatura, los cambios en la capa de hidratación de las proteínas se reflejan en cambios de estructura/conformación de la proteína y esto puede usarse para determinar las afinidades de unión receptor:ligando (Jerabek-Willemsen, M., Wienken et al. *Assay and drug development technologies* 9, 342-353 (2011). Tanto IL-6 como gp80 se marcaron con NT647 utilizando el kit Monolith labeling Red NHS (NanoTemper Technologies GmbH, Alemania). El colorante NT647 está optimizado para MST y lleva un grupo éster NHS reactivo que modifica las aminas primarias en la lisina. El marcado y la purificación se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor. Se usaron capilares tratados estándar NT.115 Series (NanoTemper Technologies GmbH, Alemania) a lo largo de los experimentos. Se usó el canal rojo de Monolith NT.115 Azul/Rojo Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, Alemania). Tanto la IL-6 como gp80 se marcaron con colorante

NT647 con una proporción de proteína a colorante superior a 0.5 para comprobar la unión únicamente de IL-6 o gp80; se usó un experimento de titulación usando VHH6 hasta 20 mM. Para determinar la unión entre VHH6 e IL-6-gp80, se usaron IL-6NT647 10 nM y gp80 20 nM, y se tituló VHH6, en una concentración que comenzaba con al menos diez veces la concentración de moléculas marcadas.

Octet - El Octet se basa en la interferometría de biocapa (BLI) para medir, p. ej. la interacción proteína:proteína y es una técnica sin marcadores. La BLI analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde dos superficies: una capa de proteína inmovilizada en la punta del biosensor y una capa de referencia interna. La interferometría de biocapa (BLI) se utilizó como una tecnología sin marcadores para la unión de proteína: proteína (Abdiche et al. *Journal of immunological methods* 382, 101-116 (2012)). Se midió la unión entre VHH6 inmovilizado en la superficie de la punta del biosensor usando puntas de NiNTA de Biosensor (ForteBio, Pall Corporation) y FusionIL-6, IL-6, gp80 e IL-6-gp80 en complejo. Los patrones de interferencia para la unión o disociación del biosensor se midieron en tiempo real para generar un perfil de respuesta en el Sistema Octet 384 Red Octet® (ForteBio, Pall Corporation).

Mediciones de SPR - Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo a 25°C en tampón HBS-P+ (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, tensioactivo P20 al 0.05 % (v/v), (GE Healthcare) como tampón de análisis. Las proteínas VHH6, IL-6, gp80 y gp130 se inmovilizaron en chips sensores CM5 (GE Healthcare) por el método de acoplamiento de amina convencional, según lo recomendado por el fabricante.

El análisis cualitativo por SPR se realizó con un BIAcore 3000 (GE Healthcare); se inyectaron gp80 y VHH6 en una concentración de 50 nM con un caudal de 30 µl/min. Se inyectó gp80 durante 180 s y se vigiló la disociación durante 360 s. Alternativamente, se inyectó gp80 durante 180 s y, posteriormente, se coinyectó VHH6 y se vigiló la disociación durante 360 s.

El análisis cuantitativo por SPR se llevó a cabo utilizando un BIAcore T200 (GE Healthcare). Las mediciones de unión se realizaron con un caudal de 100 µl/min. La proteína de interés se inyectó durante 180 s y la disociación se vigiló durante 360 s. La unión de IL-6, gp80 y VHH6 se ensayó individualmente en una serie de concentraciones (0-250 nM, como dilución seriada de dos veces). Cuando las proteínas se ensayaron en combinaciones, es decir, IL-6 y gp80, IL-6 y VHH6, gp80 y VHH6, gp80 e IL-6 y VHH6, una de las proteínas se tituló en una serie de concentraciones (0-250 nM), mientras que la otra se mantenía constante en una concentración en exceso de 2 µM para asegurar la formación del complejo. La superficie del sensor se regeneró con MgCl2 4 mM. Las curvas de unión con sustracción de fondo se analizaron usando el software de evaluación T200 (versión 1.0) siguiendo procedimientos convencionales. Debido a la complejidad de las interacciones estudiadas, el análisis de datos se limitó a los más informativos, en este caso al parámetro k_d, que se determinó ajustando a un único modelo de decaimiento exponencial los datos de disociación dentro del intervalo de 360 s.

Con el fin de evaluar el efecto de VHH6 sobre la unión del complejo IL-6-gp80 a gpl30, los datos cinéticos se ajustaron aplicando un modelo de unión 1:1. Las afinidades para las interacciones que alcanzaron el equilibrio durante el tiempo de inyección del experimento se determinaron a partir de un ajuste de afinidad de estado estacionario y se dan en las tablas complementarias. Las curvas de unión se volvieron a trazar en Prism (GraphPad Software Inc.) para representar las figuras con una mejor resolución.

Se generaron versiones mutantes de VHH6 que contenían sustituciones simples de alanina en las posiciones 27, 32, 74, 101 y 113, y sustituciones dobles de alanina en las posiciones 27/32, 74/101 y 113/101 y los líquidos sobrenadantes producidos en células transfectadas transitorias (véase el párrafo Generación de mutantes de VHH6) se ensayaron por SPR. El análisis por SPR se realizó utilizando un BIAcore 3000 (GE Healthcare). Los mutantes de VHH6 y VHH6 marcados con His (líquidos sobrenadantes diluidos 1:5) se capturaron en un chip NTA (30 µl a 10 µl/min) después de cargar la superficie por inyección de 10 µl de $NiCl_2$ 0.5 M. Se inyectó una mezcla equimolar de IL-6 y gp80 (50 nM cada uno) durante 300 s con un caudal de 10 µl/min seguido de una fase de disociación de 300 s. Al final de cada ciclo, la superficie del chip se regeneró por inyección de EDTA 350 mM (2 × 10 µl).

Cultivo de células - Las células HUVEC agrupadas se compraron de Gibco (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se cultivaron en medios 200PRF complementados con medios con suplemento de suero bajo (Gibco, Thermo Fisher Scientific). En los experimentos se ensayaron diferentes lotes de células HUVEC con el fin de tener una buena representación de la población. Las células no se utilizaron más allá del 5-6º pase.

Tinción de fosfo-STAT3 - Las células se sembraron el día anterior con 1×10^4 células/pocillo en placas tratadas de cultivo de tejidos BD Falcon Becton negro/transparente de 96 pocillos (Becton Dickinson). Al día siguiente, las células se trataron con FusionIL-6 (3 ng/ml) e IL-6+gp80 solas (respectivamente 10 ng/ml y 20 ng/ml) o en combinación con un exceso de VHH6 y se fijaron con PFA al 4% en los tiempos de medición elegidos (30 min, 180 min y 360 min). Después de 20 min de incubación a TA, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadió metanol helado y se almacenaron a -20°C. Antes de la tinción, las células se lavaron dos veces en PBS, se incubaron durante 20 min a 4°C con PBS/FCS al 10%. Posteriormente, se añadió anti-fosfo-STAT3 (Tyr705) (clon D3A7, Cell Signalling) a la dilución sugerida por el fabricante (1:100 en PBS/FCS al 10%) y se incubó durante 1 h a 4°C. Después de lavar dos veces en PBS, se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo-AlexaFluor568 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se incubó durante 1 hora a 4°C. Luego, las células se lavaron dos veces en PBS y los núcleos se tiñeron durante 10 min con una solución de DAPI en PBS/FCS al 10% (concentración final de 2 mg/ml). Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadieron

200 µl de PBS reciente a cada pocillo y se almacenaron en la oscuridad a 4°C.

internalización de complejo IL-6-gp80 - Las células se sembraron el día anterior con 1×10^4 células/pocillo en placas BD BIOCOAT Cell Environment Collagen Cellware negro/transparente de 96 pocillos (Becton Dickinson). Al día siguiente, las células se trataron con IL-6-NT647 solo (100 ng/ml), IL-6-NT647+gp80 (respectivamente 100 ng/ml y 200 ng/ml) con y sin la adición de un exceso de VHH6 y se fijaron con PFA al 4% en los tiempos de medición elegidos. Después de 20 min de incubación a TA, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadió metanol helado y se almacenaron a -20°C. Antes de la tinción, las células se lavaron dos veces en PBS, se incubaron durante 20 min a 4°C con PBS/FCS al 10%. Posteriormente, se añadió anticuerpo anti-LAMP1 de ratón (clon H4A3, Abcam) a la dilución sugerida por el fabricante (1:100 en PBS/FCS al 10%) y se incubó durante 1 h a 4°C. Después de lavar dos veces en PBS, se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón-AlexaFluor488 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se incubó durante 1 h a 4°C. Luego, las células se lavaron dos veces en PBS y los núcleos se tiñeron durante 10 min con una solución de DAPI en PBS/FCS al 10% (concentración final 2 mg/ml). Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 200 µl de PBS reciente a cada pocillo y se almacenaron en la oscuridad a 4°C.

Adquisición y análisis de imágenes - Las imágenes se adquirieron usando Cellomics Arrayscan (Thermoscientific). Para cada pocillo, se capturaron 16 campos que contenían aproximadamente 100 células por campo a una resolución de 1104×1104 píxeles. DAPI, Alexa488, Alexa568 y Alexa647 se detectaron utilizando conjuntos de filtros de excitación y emisión apropiados. Los tiempos de exposición se mantuvieron constantes entre experimentos repetidos.

Las células se analizaron usando el algoritmo detector de manchas de Cellomics. Los núcleos se detectaron basándose en la tinción de DAPI y la intensidad de STAT3 medida dentro de esta región. El parámetro "intensidad total de manchas por objeto" se usó para análisis posteriores. Para el análisis de IL-6-NT647 internalizada, la máscara para el análisis se extendió desde los núcleos y la intensidad de NT-647 se midió a partir de las manchas detectadas en esta región.

Análisis estadístico - Los datos sin procesar del análisis de Arrayscan se procesaron usando el parámetro "intensidad total de manchas por objeto", y este parámetro de tres repeticiones se analizó estadísticamente usando un modelo mixto lineal para mediciones repetidas usando el paquete de software SAS 9.2 (Instituto SAS, Cary NC).

Matriz de qPCR - Brevemente, se sembraron células HUVEC en una concentración de 5×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos (Falcon, BD Biosciences) el día anterior. A la mañana siguiente, las células se trataron con gp80+IL-6 y VHH6+gp80-+L-6 en la misma concentración utilizada para la tinción de pSTAT3 durante 30, 180 y 360 min. En diferentes tiempos de medición, las células se lavaron dos veces con PBS, se volvieron a suspender en tampón de lisis (Qiagen) y se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -80°C.

Se extrajo el ARN total de los lisados de células HUVEC con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) y se cuantificó con un Nanodrop (Thermo Fisher). Usando el Kit de primera cadena de ADNc RT^2 (SABiociences, Qiagen) se convirtieron 400 ng de ARNm en ADNc de acuerdo con el protocolo del fabricante. La matriz de ruta de señalización "IL-6 humana/STAT3 Plus" (PAHS-160YE-4) diseñada para medir cuantitativamente niveles de ARNm de 84 genes clave implicados en la señalización de IL-6, formato de 384 pocillos, se analizó en una máquina ABI 7900HT. Los datos se analizaron utilizando la plantilla de análisis de datos basada en la web de la matriz de PCR de perfilador RT2 v3.5 (http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php) y los cambios en la expresión génica se calcularon utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ con normalización de los datos sin procesar respecto a los genes de mantenimiento. Cada una de las placas de la matriz de PCR del perfilador RT^2 contenía 84 genes relacionados con la ruta de la IL-6 más 5 genes de mantenimiento diferentes. Se analizaron juntas tres repeticiones biológicas independientes de los mismos experimentos. Solo se mostraron resultados estadísticamente significativos ($p\leq0.05$) junto con el valor de p.

Materiales y métodos - Determinación de la estructura

Cristalografía de rayos X - El complejo de IL-6, gp80 y VHH6 se preparó utilizando la construcción gp80V4 modificada (descrita en producción y purificación de proteínas). Los restos adicionales del dominio 1 para gp80 eran necesarios ya que realizan una variedad de interacciones intramoleculares con el dominio 2, como se observa en la estructura de rayos X aislada de gp80 (entrada en PDB 1N26). La mayoría de los restos del dominio 1 no se ven en la estructura de rayos X debido al desorden molecular, aunque el enlace disulfuro de cisteínas (Cys25-Cys193) aún se conserva y es claramente visible. El VHH6, gp80 e IL-6 purificados se mezclaron en una proporción molar de 2:1:1 y se incubaron durante la noche a 4°C para permitir la formación del complejo. El complejo se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC) sobre una columna HiLoad 16/60, Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con NaCl 50 mM, Tris 25 mM, glicerol al 5% (v/v). Las fracciones que contenían el complejo se juntaron y se concentraron a 9 mg/ml para cristalografía. Las condiciones adecuadas para el crecimiento de cristales se identificaron mediante el método de difusión de vapor de gota sedente utilizando cribados de cristalización disponibles comercialmente (Qiagen). Para generar cristales de calidad de difracción, se utilizó el método de difusión de vapor de gota colgante. Se mezcló 1 µl de solución de proteína con 1 µl de solución de reserva que contenía MES 0.1 M, pH 6.5, PEG20K al 14%. Los cristales alcanzaron su tamaño completo en 14 días a 19°C. Los cristales se recogieron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido sin crioprotector adicional. Se recogieron los datos de difracción a 2.7 Å de un monocristal en la línea del haz proximal en Soleil Synchrotron, Francia, y se procesaron usando XDS (Kabsch, W. Xds. *Acta crystallographica*. Sección D, *Biological crystallography* 66, 125-132 (2010)).. La estructura del complejo se

resolvió por reemplazo molecular con Phaser (McCoy, AJ et al. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674 (2007)), utilizando las coordenadas de una estructura de VHH interna, y de IL-6 y gp80 de la entrada en PDB 1P9M (Boulanger MJ et al. *Science* 300, 2101-2104 (2003)), como modelos de búsqueda. La estructura inicial se refinó con ciclos iterativos de reasociación simulada, minimización de energía y reconstrucción manual utilizando CNS (Brunger, A. T. et al. "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination". *Acta crystallographica*. Sección D, *Biological crystallography* 54, 905-921 (1998) y Brunger, A. T. "Version 1.2 of the Crystallography and NMR system". *Nature protocols* 2, 2728-2733 (2007)) y COOT (Emsley, P. y Cowtan, K. "Coot: model-building tools for molecular graphics". *Acta crystallographica*. Sección D, *Biological crystallography* 60, 2126-2132 (2004)). La geometría del modelo se validó utilizando Molprobity (Chen, V. B. et al. "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography". *Acta crystallographica*. Sección D, *Biological crystallography* 66, 12-21 (2010)). Las áreas superficiales de las interfaces de proteínas se calcularon usando PISA (Krissinel, E. y Henrick, K. "Inference of macromolecular assemblies from crystalline state". *Journal of molecular biology* 372, 774-797 (2007)). Las visualizaciones moleculares se generaron con Pymol (DeLano W., The PyMOL Molecular Graphics System., 2002, versión 1.7, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA. www.pymol.org). La recogida de datos y los estadísticos de refinamiento se resumen a continuación:

Tabla 2: Recogida de datos y estadísticos refinamiento

	Anticuerpo de epítopo de conexión en complejo con IL-6 y gp80
Recogida de datos	
Grupo espacial	C 1 2 1
Dimensiones de la celda	
***a**, b, c* **(Å)**	249.03, 67.80, 78.16
α, β, γ (°)	90.00, 104.53, 90.00
Resolución (Å)	47.84-2.70(2.86-2.69) *
Rmeas (%)	7.2(50.1)
$CC_{1/2}$ (%)	99.9(91.5)
$I/\sigma I$	20.88(3.97)
Completitud (%)	99.4(96.9)
Redundancia	7.5(7.5)
Refinamiento	
Resolución (Å)	20.00-2.70
Nº de reflexiones	34 870
$R_{trabajo}/R_{libre}$	0.2313/0.2872
Nº de átomos	
Proteína	7590
Agua	111
B-factores	
Proteína	56.33
Agua	43.19
Desviaciones R.m.s.	
Longitudes de enlace (Å)	0.007
Ángulos de enlace (°)	1.289

*Los valores entre paréntesis son para la capa de mayor resolución.

Generación de mutantes de VHH6 - Para investigar la contribución a la unión de IL-6 y gp80 por restos de VHH6 identificados en la estructura cristalina como posibles restos de contacto, se generó un panel de mutantes usando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. Después de la expresión transitoria a pequeña escala en células ExpiHEK, los líquidos sobrenadantes se analizaron por SPR. La *k*d generada usando los líquidos sobrenadantes de los mutantes simples y dobles se compararon con el líquido sobrenadante de VHH6.

HDX-MS - El complejo gp80V4-IL-6 40 mM o gp80V4-IL-6-VHH6 40 mM, ambos purificados por SEC, se diluyeron 20x en fosfato 10 mM en H_2O (pH 7.0), o en fosfato 10 mM en D_2O (pD 7.0) y se dejó reaccionar durante 0.5, 2, 10, 30 o 120 min. Después de la reacción, estos se diluyeron 1:1 con una solución inactivada en frío (1°C, Gdn.HCl 3.4 M, TCEP 500 mM, fosfato 200 mM) para dar un pH final de 2.5. Esta mezcla se inyectó inmediatamente en el módulo de HDX

nanoAcquity (Waters Corp.) para la digestión péptica. Todas las etapas de manipulación de líquidos fueron realizadas por un robot LEAP-PAL (CPC). Las muestras de proteínas se lavaron en la columna de pepsina Enzymate (25°C) con HCOOH al 0.1% en H_2O con un caudal de 90 ml × min^{-1}, y los péptidos resultantes se atraparon en una columna de captura VanGuard C18 durante 3 min. Estos péptidos se eliminaron por lavado de la columna de captura invirtiendo el flujo y se separaron en una columna BEH C18 (10 x 1.0 cm, 1.7 µm), usando el siguiente gradiente: 0 min, 5% de B; 7 min, 40% de B; 8 min, 95% de B; 10 min, 95% de B, 11 min, 5% de B (B: HCOOH al 0,2% en H_2O, A: HCOOH al 0,1% en MeCN). La adquisición de datos se realizó en un Synapt G2S (Waters Corp.) ejecutado en modo Tofonly en un intervalo de m/z de 50-2000 Th, utilizando un método MSe (energía de colisión baja, 10 V; energía de colisión alta: rampa de 15 V a 35 V). El péptido Glu-1-Fibrinopéptido B se usó para la corrección de masa de bloqueo interno.

Procesamiento de datos de HDX-MS - Los datos se recogieron por triplicado, con análisis en blanco entre cada punto de datos. Los resultados de MSe de la muestra diluida con H_2O se analizaron utilizando PLGS v3.0.1, buscando péptidos en una base de datos de secuencias de IL-6 y gp80V4 únicamente, con un umbral de intensidad de precursor de 500 recuentos y se requieren 3 iones de producto coincidentes para la asignación. Los archivos de recuentos de iones para las 6 muestras de control se combinaron en una lista de péptidos importada al software Dynamx v2.0, que se seleccionó aún más para rechazar péptidos con una intensidad de energía baja inferior a 100, péptidos de más de 25 aminoácidos de longitud y péptidos que eluyen con un tiempo de retención superior a 9 minutos. Se utilizó Dynamx v2.0 para cuantificar las envolturas isotópicas resultantes de la captación de deuterio para cada péptido en cada punto de tiempo; estos datos luego se consultaron manualmente para asegurar la asignación correcta de los picos m/z. Se realizaron pruebas t de Student en los puntos de datos por triplicado para cada punto de tiempo, y la significación del HDX diferencial entre gp80V4-L-6 y gp80V4-IL-6-VHH6 se definió como $p<0.01$.

Resultados

VHH6 reconoce específicamente el complejo IL-6-gp80

La inmunización de camellos con HyperIL-6, una proteína de fusión de gp80 unida a IL-6 con un conector peptídico flexible y el posterior descubrimiento de anticuerpos condujo a la generación de 41 secuencias únicas de VHH. Los 41 VHH reconocían HyperIL-6 y FusionIL-6 en un cribado por ELISA inicial. FusionIL-6 era una proteína de fusión diseñada internamente entre IL-6 y gp80. Estos 41 VHH se separaron según su capacidad para unirse a IL-6 (30 VHH) o gp80 (7 VHH). Cuatro VHH reconocían solo FusionIL-6, pero ni IL-6 ni gp80 solos. Con estos, VHH6 se continuó para una mayor caracterización, debido a su rendimiento superior en el sistema de expresión transitoria. Los datos generados usando ELISA (Fig. 7a), termoforesis a microescala (MST, Fig. 7b) e interferometría de biocapas (Octet, Fig. 7c) y cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Fig. 7d) mostraron que VHH6 es capaz de reconocer y unirse solo al complejo IL-6-gp80.

VHH6 aumenta la estabilidad del complejo IL6-gp80

Cuatro técnicas biofísicas independientes indicaron claramente que VHH6 reconoce específicamente el complejo entre IL-6 y gp80. Esto sugería que VHH6 reconocía un cambio conformacional en una de las proteínas o un epítopo en la interfaz del complejo IL-6-gp80. Para comprender la naturaleza del epítopo, se determinó la estructura cristalina del complejo VHH6-IL-6-gp80 (véase la tabla 2 antes). El complejo cristalizó en el grupo espacial C 121 y se refinó a 2.7 Å. La estructura cristalina confirmó que VHH6 se une a un epítopo que se extiende a lo largo de la interfaz de IL-6 y gp80. Más específicamente, se une a la conexión de IL-6 y el dominio I de gp80 permaneciendo los sitios II y III en IL-6 accesibles para la unión por gp130 (Fig. 8a). VHH6 se une a un epítopo que se divide espacialmente entre IL-6 y gp80 casi uniformemente (45% de la superficie del epítopo se encuentra en IL-6 y 55% en gp80).

Las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) están implicadas en la unión (Fig. 8b). La unión a IL-6 es mediada por múltiples enlaces de hidrógeno de las cadenas laterales de Tyr27, Tyr32, Ser101 y el grupo NH de la cadena principal de la Ile102 (Fig. 8c). También hay un único puente salino de la Lys113 y una probable interacción alifática entre Tyr27 y Glu23 de la IL-6. La unión a gp80 es mediada por múltiples enlaces de hidrógeno de los grupos CO de la cadena principal de Ser30, Thr31, Asn54 y la cadena lateral de Asn74 (Fig. 8d).

Para evaluar las contribuciones de las cadenas laterales a la unión, se generaron sustituciones de alanina simples en las posiciones 27, 32, 74, 101 y 113, y sustituciones de alanina dobles en las posiciones 27/32, 74/101 y 113/101. Se capturaron VHH6 marcados con His o formas mutantes del líquido sobrenadante sobre un chip NTA cargado con níquel y se inyectó una mezcla equimolar de IL-6 y gp80 a lo largo de un período de inyección de 300 s. En un sistema de tres componentes, no se pueden calcular constantes de velocidad de asociación significativas. Sin embargo, se determinaron las constantes de velocidad de disociación, que son independientes de la concentración. Para los mutantes de un solo resto, las velocidades de disociación eran muy similares a las de VHH6 excepto para el mutante Y27A que mostró un aumento de 1.9 veces. Todas las velocidades de disociación para los mutantes dobles aumentaron, observándose aumentos de 3.8 y 4.3 veces para los mutantes dobles Asn74Ala/Ser101Ala y Ser101Ala/Lys113Ala respectivamente (Tablas 3 y 4). Estos datos confirmaron el papel en la unión de los contactos identificados en la estructura cristalina.

Tabla 3: Mutantes individuales de VHH6

	koff (1/s)
wtVHH6	3.6E-04
N74A	1.5E-04
K113A	2.6E-04
Y32A	3.0E-04
S101A	3.9E-04
Y27A	7.0E-04

Tabla 4: mutantes dobles de VHH6

	koff (1/s)
wtVHH6	3.6E-04
Y27A Y32A	4.3E-04
N74A S101A	13.5E-04
K113A S101A	14.3E-04
K113S S101A	16.4E-04

Para comprender cómo afecta VHH6 a la dinámica estructural de la interacción IL-6-gp80, se usó HDX-MS (Konermann, L., Pan, J. y Liu, Y.H. "Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics". *Chemical Society reviews* 40, 1224-1234 (2011)) (véase la Figura 9a-b). Una menor cantidad de intercambio de deuterio es indicativo de una dinámica estructural menor y/o la protección de esa región por un suceso de unión, mientras que un intercambio mayor indica un aumento en la dinámica. Los datos se obtienen a nivel de péptido, por lo que los cambios observados pueden atribuirse a uno o más de los restos contenidos en él. Se observó una menor captación de deuterio en presencia de VHH6 para las secuencias SSERIDKQ (SEQ ID NO: 11) y KDGCFQSCFNEE (SEQ ID NO: 12) (restos 21-28 y 70-81) en IL-6 y LSVTWQD (SEQ ID NO: 13) y MVKDLQHHAVIHD (SEQ ID NO: 14) (restos 215-221 y 250-262) en gp80, cada uno de los cuales contiene restos situados dentro de la interfaz de VHH6, lo que refuerza que el epítopo abarca ambas proteínas. No se obtuvieron datos para los restos 179-184 (RALRQM; SEQ ID NO: 15) en el extremo C-terminal de la IL6, que también se espera que interaccione directamente con el VHH. Los péptidos en las regiones MTTHLILRSFKEFLQSSL (SEQ ID NO: 16) (restos 161-178, IL-6) y PEGDSSFY (SEQ ID NO: 17) y RAQEEFGQGEWSE (SEQ ID NO: 18) (restos 162-169 y 274-286, gp80) también mostraron una disminución de HDX en presencia de VHH (Figura 9a, derecha); estos están situados en la interfaz IL6-gp80, lo que sugiere un estrechamiento de la interacción que aquí da como resultado una dinámica estructural reducida. Finalmente, se muestra que los restos 126-144, LQKKAKNLAITTPDPTTN (SEQ ID NO: 19), en la IL6 son menos dinámicos en presencia de VHH6 (Figura 9a, izquierda); de hecho, estos se resuelven en la estructura cristalina del trímero mientras que son demasiado flexibles para ser modelizados en la estructura de IL6 sola (1ALU), lo que indica una vez más un aumento en la rigidez estructural aquí tras la unión de VHH. También hay una indicación de un cambio conformacional/dinámico alostérico que ocurre en el lado distal de la IL6 (RKETCNKSNM, restos 40-49; SEQ ID NO: 20). Para obtener una lista más completa de péptidos que solapan definidos mediante la comparación de patrones de HDX, véase las tablas 5 y 6.

Tabla 5: Péptidos en la IL-6 identificados y cuantificados por HDX-MS. El asterisco negro (*) indica la captación de deuterio que aumenta la presencia de VHH6; # indica que la captación de deuterio disminuye en presencia de VHH6.

Resto inicial	Resto final	Secuencia	2 puntos de tiempo con p<0.01	4 puntos de tiempo con p<0.01	SEQ ID NO
0	11	APVPPGEDSKDV			21
3	23	PPGEDSKDVAAP HRQPLTSSE			22
21	28	SSERIDKQ	*		11
21	31	SERIDKQIRY	*		23
22	31	SERIDKQIRY	*		24
24	33	RIDKQIRYIL	*	*	25
25	36	IDKQIRYILDGI	*	*	26
29	39	IRYILDGISAL			27

Resto inicial	Resto final	Secuencia	2 puntos de tiempo con p<0.01	4 puntos de tiempo con p<0.01	SEQ ID NO
38	49	ALRKETCNKSSN M	#		28
39	49	LRKETCNKSNM	#		29
40	49	RKETCNKSNM	#		20
40	51	RKETCNKSNMMC E			30
41	61	KETCNKSNMCES SKEALAENN	#		31
42	56	ETCNKSNMCESS KEA			32
52	75	SSKEALAENNLN LPKMAEKDGCF Q			33
53	63	SKEALAENNLN			34
53	75	SKEALAENNLNL PKMAEKDGCFQ			35
55	65	EALAENNLNLP			36
58	67	AENNLLNLPKM			37
58	74	AENNLLNLPKMA EKDGCF	*	*	38
59	80	ENNLLNLPKMAE KDGCFQSGFNE	*		39
60	67	NNLNLPKM			40
60	70	NNLNLPKMAEK			41
60	82	NNLNLPKMAEK DGCFQSGFNEET	*		42
68	74	AEKDGCF	*	*	43
70	81	KDGCFQSGFNEE	*		44
75	84	QSGFNEETCL			45
85	92	VKIITGLL			46
85	93	VKIITGLLE			47
87	93	IITGLLE			48
98	108	LEYLQNRFESS			49
99	109	EYLQNRFESSE			50
99	110	EYLQNRFESSEE			51
99	112	EYLQNRFESSEE QA			52
99	120	EYLQNRFESSEE QARAVQMSTK			53
100	110	YLQNRFESSEE			54
100	112	YLQNRFESSEEQ A			55
104	114	RFESSEEQARA			56
106	112	ESSEEQA			57
106	116	ESEEQARAVQ			58
109	116	EEQARAVQ			59
115	122	VQMSTKVL			60
115	122	VQMSTKVL			61
120	126	KVLIQFL			62
123	135	IQFLQKKAKNLD			63
126	133	LQKKAKNL	*		64
126	135	LQKKAKNLDA	*		65

Resto inicial	Resto final	Secuencia	2 puntos de tiempo con p<0.01	4 puntos de tiempo con p<0.01	SEQ ID NO
126	144	LQKKAKNLDAIT TPDPTTN	*		66
126	145	LQKKAKNLDAIT TPDPTTNA			67
126	147	LQKKAKNLDAIT TPDPTTNASL	*		68
129	143	KAKNLDAITTPD PTT			69
136	147	ITTPDPTTNASL	*	*	70
148	155	LTKLQAQN			71
148	155	LTKLQAQN			72
148	158	LTKLQAQNQWL			73
148	160	LTKLQAQNQWLQD			74
152	158	QAQNQWL			75
159	165	QDMTTHL	*		76
159	167	QDMTTHLIL	*		77
161	167	MTTHLIL	*		78
166	172	ILRSFKE	*	*	79
166	173	ILRSFKEF	*	*	80
166	174	ILRSFKEFL	*		81
168	174	RSFKEFL	*	*	82
168	178	RSFKEFLQSSL	*	*	83

Tabla 6: Péptidos en gp80 identificados y cuantificados por HDX-MS. El asterisco negro indica una captación de deuterio que aumenta la presencia de VHH6.

Resto inicial	Resto final	Secuencia	2 puntos de tiempo p<0.01	4 puntos de tiempo con p<0.01	SEQ ID NO
66	86	HENLYFQGLAPRR CPAQEVAR			84
73	82	GLAPRRCPAQ			85
73	83	GLAPRRCPAQE	*		86
73	85	GLAPRRCPAQEVA	*		87
78	96	RCPAQEVARGAG AGDVPPE			88
81	102	AQEVARGAGAGD VPPEEPQLSC	*		89
82	95	QEVARGAGAGDVPP			90
83	94	EVARGAGAGDVP	*		91
84	100	VARGAGAGDVPPEEPQL	*		92
86	100	RGAGAGDVPPEEP QL	*		93
92	110	DVPPEEPQLSCFRK SPLSN	*		94
94	100	PPEEPQL			95
103	111	FRKSPLSNV			96
105	123	KSPLSNVVCEWGP RSTPSL			97
111	123	VVCEWGPRSTPSL			98
112	123	VCEWGPRSTPSL			99
115	129	WGPRSTPSLTTKAVL			100

Resto inicial	Resto final	Secuencia	2 puntos de tiempo p<0.01	4 puntos de tiempo con p<0.01	SEQ ID NO
124	130	TTKAVLL			101
130	141	LVRKFQNSPAED			102
131	141	VRKFQNSPAED			103
135	145	QNSPAEDFQEP			104
139	158	AEDFQEPCQYSQE SQKFSCQ			105
141	147	DFQEPCQ			106
146	164	CQYSQESQKFSCQLAVPEG			107
147	164	QYSQESQKFSCQLAVPEG			108
148	158	YSQESQKFSCQ			109
152	158	SQKFSCQ			110
157	170	CQLAVPEGDSSFYI			111
159	168	LAVPEGDSSF	*		112
162	168	PEGDSSF	*		113
174	183	CVASSVGSKF			114
176	183	ASSVGSKF			115
195	205	LQPDPPANITV	*		116
201	210	ANITVTAVAR			117
206	216	TAVARNPRWLS	*		118
207	214	AVARNPRW			119
208	214	VARNPRW			120
208	217	VARNPRWLSV	*		121
208	218	VARNPRWLSVT	*		122
218	229	TWQDPHSWNSSF	*		123
221	229	DPHSWNSSF			124
230	236	YRLRFEL			125
235	245	ELRYRAERSKT			126
237	245	RYRAERSKT			127
243	256	SKTFTTWMVKDL QH	*	*	128
250	262	MVKDLQHHAVIHD	*		14
250	266	MVKDLQHHAVIHDAWSG	*	**	129
250	273	MVKDLQHHAVIH DAWSGLRHVVQL	*		130
265	273	SGLRHVVQL			131
267	273	LRHVVQL			132
268	275	RHVVQLRA			133
274	283	RAQEEFGQGE	*	**	134
274	284	RAQEEFGQGEW	*	*	135
274	286	RAQEEFGQGEWSE	*	**	18
277	295	EEFGQGEWSEWSP EAMGTP			136
280	296	GQGEWSEWSPEA MGTPW			137
284	291	WSEWSPEA	*		138
284	298	WSEWSPEAMGTP WTE			139
284	303	WSEWSPEAMGTP WTESRSPP			140
285	291	SEWSPEA			141

Resto inicial	Resto final	Secuencia	2 puntos de tiempo p<0.01	4 puntos de tiempo con p<0.01	SEQ ID NO
285	298	SEWSPEAMGTPW TE			142
285	303	SEWSPEAMGTPW TESRSPP			143
287	298	WSPEAMGTPWTE			144
289	303	PEAMGTPWTESRSPP			145
292	298	MGTPWTE			146

Para investigar el efecto de VHH6 en la cinética de unión del complejo IL-6-gp80, se realizó un experimento de SPR cualitativo, inmovilizando la IL-6 sobre un chip CM5 e inyectando gp80. Como era de esperar para una interacción transitoria de citoquina-receptor, se observaron fases tanto de asociación como de disociación rápida (Fig. 10a). La inyección de VHH6 al comienzo de la fase de disociación de gp80 anuló la disociación de gp80 de la IL-6 inmovilizada. VHH6 redujo la constante de velocidad de disociación (k_{off}) para la unión de gp80 a IL-6 225 veces desde 0.045 s^{-1} a 0.0002 s^{-1} (Figura 10a). Para abreviar, las Fig. 10a y b solo dan los sensogramas de SPR para la inmovilización de IL-6. Se obtuvieron resultados similares cuando se inmovilizaron gp80 o VHH6 (Tablas 7-10). Estos datos demuestran que no solo VHH6 se une al complejo IL-6-gp80, sino que impide significativamente la disociación de IL-6 de gp80.

Tabla 7

IL-6 inmovilizada	k_{off} (1/s)	SE (k_{off})	K_D (M)	SE (K_D)
gp80	0.046	5.40E-05	3.42E-08	7.20E-09
gp80+VHH6 (2 µM)	1.94E-04	1.90E-07	NA	

Tabla 8

gp80 inmovilizado	k_{off} (1/s)	SE (k_{off})	K_D (M)	SE (K_D)
IL-6	0.048	4.70E-05	1.54E-08	1.50E-09
IL-6+VHH6 (2 µM)	2.10E-04	2.80E-07	NA	

Tabla 9

VHH6 inmovilizado	k_{off} (1/s)	SE (k_{off})	K_D (M)
IL-6+gp80 (2 µM)	3.09E-04	4.40E-07	NA
gp80+IL-6 (2 µM)	3.75E-04	6.00E-07	NA

Tabla 10

gp130 inmovilizado	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
gp80 (IL-6 (2 µM))	3.6 10^5	0.037
gp80 (IL-6 (2 µM) VHH6 (2 µM))	4.7 10^5	0.029
IL-6 (gp80 (2 µM))	3.6 10^5	0.035
IL-6 (gp80 (2 µM) VHH6 (2 µM))	4.4 10^5	0.036

El modelo creado superponiendo la estructura cristalina resuelta para VHH6-IL-6-gp80 sobre los datos publicados para el complejo IL-6-gp80-gp130 (Boulanger, M.J., Chow, D.C., Brevnova, E.E. y García, K.C. "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex". *Science* 300, 2101-2104 (2003)) (PDB 1P9M) indicó que VHH6 no bloquearía la unión de IL-6—gp80 a gp130 (Fig. 14). Para confirmar esto, se inmovilizó el dominio extracelular de gp130 sobre el chip y se ensayó una mezcla que contenía IL-6-gp80 o VHH6-IL-6-gp80. Como se predijo, VHH6 no perjudicó la unión del complejo IL-6-gp80 a gp130 (Fig. 10c). Además, la estabilización por VHH6, no afectó a la cinética de la unión del complejo IL-6—gp80 a gp130. VHH6 modula la señalización de IL-6 en un modelo celular para señalización *trans*

La siguiente etapa en la caracterización de VHH6 era explorar los resultados celulares después de la estabilización del complejo IL-6—gp80. El reclutamiento de gp130 por IL-6-gp80 conduce a una serie de sucesos de fosforilación

que finalmente culminan en la fosforilación de moléculas transductor de señal y activador de transcripción 3 (pSTAT3). Las moléculas STAT3 fosforiladas se translocan a los núcleos (Heinrich, P.C. et al. "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation". *The Biochemical journal* 374, 1-20 (2003)), donde activan la transcripción de genes implicados en la respuesta a IL-6. La fosforilación de STAT3 inducida por IL-6 alcanza su máximo a los 30 min después de la estimulación, y aunque se agota en gran medida en el espacio de 60-90 min, se observa una segunda ola después de 4 h (Wang, Y., van Boxel-Dezaire, A.H., Cheon, H., Yang, J. y Stark, G.R. "STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 16975-16980 (2013)). Se postuló que la adición de VHH6 a la mezcla de IL-6 y gp80 aumentaría la magnitud de la fosforilación de STAT3, imitando así los efectos de HyperIL-6 *in vitro.*

Para tener un sistema controlado, se añadieron IL-6 y gp80 en una proporción estequiométrica 1:1 a células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), un sistema bien establecido *in vitro* de señalización trans de IL-6 (Romano, M. et al. "Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment". *Immunity* 6, 315-325 (1997)). Las células HUVEC se trataron con IL-6+gp80, VHH6+IL-6+gp80, y la fosforilación de STAT3 se cuantificó en diferentes puntos de tiempo usando microscopía de fluorescencia de alto rendimiento. FusionIL-6 también se incluyó como control interno en todos los experimentos (Fig. 15). Como se esperaba, VHH6+IL-6+gp80 mostraba una mayor respuesta que la mezcla de IL-6 y gp80, con una intensidad comparable a FusionIL-6 a los 30 min (Fig. 15) y efectos sostenidos en puntos de tiempo posteriores (Fig. 11). La adición de VHH6 a la mezcla de IL-6 y gp80 mostraba claramente una mayor activación de pSTAT3 a los 30 min, detectándose predominantemente la señal de pSTAT3 en el compartimento nuclear (Fig. 11a). Curiosamente, el tratamiento con VHH6 promovía una activación significativa y sostenida de pSTAT3 en puntos de tiempo posteriores (Fig. 11b-c).

La fosforilación de STAT3 es una prueba indirecta de que la estabilización del complejo es fundamental para maximizar los efectos de la IL-6. De hecho, una prueba adicional sería vigilar el tráfico intracelular de IL-6 en presencia o ausencia de VHH6. Se investigó si la activación incrementada y sostenida de STAT3 debido a VHH6 era atribuible a una internalización alterada de IL-6—gp80, usando IL-6 marcada con NT647. La Fig. 11d muestra un experimento de evolución temporal representativo con acumulación de IL-6-NT647 en vesículas a los 30, 180 y 360 min. Además, la acumulación de IL-6-NT647 se colocalizó con LAMP-1, lo que indica que IL-6NT647 se ha absorbido en vesículas (Fig. 11e). VHH6 promovió un aumento significativo en la acumulación intracelular de IL-6-NT647 tan pronto como a los 15 min y aumentó con el tiempo en comparación con IL-6-gp80 (Fig. 11f).

Para investigar más a fondo los efectos celulares de la fosforilación extendida de STAT3 y la acumulación de IL-6 en vesículas intracelulares, se realizó un perfil transcriptómico de células HUVEC utilizando una matriz de qPCR diseñada específicamente para la ruta de IL-6. La respuesta de señalización trans al tratamiento con IL-6-gp80 se comparó en ausencia (grupo de control) y presencia de VHH6 (muestras tratadas). Un mapa de calor generado a partir de tres repeticiones juntas sugería claramente que, a pesar de la variabilidad intrínsecamente relacionada con las células primarias, el tratamiento con VHH6 afectaba solo a unos pocos genes relacionados con citoquinas/quimioquinas o factores de transcripción en la señalización de IL-6 (Fig. 16) y está relacionado con la duración del tratamiento. Esos genes se agruparon en tres categorías: quimioquinas/citoquinas, factores de transcripción y moléculas de señalización (Fig. 12a-c). De los genes de quimioquinas y citoquinas, aumentaron los transcritos *de CCL2, IL6* y *IL6ST*, mientras que disminuyeron los de *TNF* con el tiempo. Los genes de factores de transcripción para *CEBPD* y *JUNB* eran regulados por aumento en todo momento, mientras que *NFKB1* seguía un patrón de aumento-disminución-aumento. La molécula de señalización *SOCS3* era regulada por aumento en todo momento; *STAT3* y *JAK2* mostraron una distribución ondulatoria, mientras que *JAK3* y *TYK2* aumentaban con el tiempo. Estos resultados apuntaban hacia una mayor respuesta inflamatoria en las células HUVEC debido al tratamiento con VHH6.

Discusión

VHH6 es un anticuerpo de fijación prototipo que reconoce un epítopo recién formado en la conexión donde IL-6 y gp80 interaccionan para formar un complejo transitorio antes de reclutar al receptor de señalización gp130. Los métodos descritos anteriormente combinan varios enfoques para demostrar la naturaleza del epítopo de conexión de VHH6 y su capacidad para estabilizar el complejo entre IL-6 y gp80 al fijar las dos proteínas.

HDX-MS puso de manifiesto cómo VHH6 altera la dinámica o "transpirabilidad" que caracteriza la estructura del complejo IL-6-gp80. La cristalografía de rayos X confirmó que VHH6 une las dos moléculas sin interferir con el reclutamiento de gp130 en el complejo de señalización. Una vez que se forma el complejo ternario VHH6-IL-6-gp80, IL-6 y gp80 ya no pueden disociarse, como se muestra en los experimentos de SPR.

La alteración de la cinética entre IL-6 y gp80 ha permitido resolver la estructura del complejo IL-6-gp80 en ausencia de gp130. VHH6 se acopla simultáneamente con dos proteínas utilizando sus CDR. VHH6 difiere de los anticuerpos biespecíficos, específicamente modificados para dirigirse a dos proteínas simultáneamente. En la bibliografía hay varios ejemplos de anticuerpos de conexión. Dixin et al. (Diskin, R., Marcovecchio, P.M. y Bjorkman, P.J. "Structure of a clade C HIV-1 gp120 bound to CD4 and CD4-induced antibody reveals anti-CD4 polyreactivity". *Nature structural & molecular biology* 17, 608-613 (2010)), describieron un epítopo bimolecular de scFv donde una CDR del dominio VH se pone en contacto con CD4 y una CDR del dominio VL se pone en contacto con gp120. Impagliazzo et al. describieron recientemente la estructura cristalina de un anticuerpo neutralizante capaz de estabilizar el tallo de hemaglutinina (Impagliazzo, A., et al. "A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen". *Science*

349(6254),1301-1306 (2015)), mientras que Lee et al. publicaron un ejemplo de un anticuerpo (KZ52) que se acopla con tres segmentos discontinuos de las proteínas GP1 y GP2 del virus del Ébola (Lee, J.E., et al. "Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor". *Nature* 454(7201), 177-82 (2008)).

Sin embargo, VHH6 es el prototipo de un anticuerpo que estabiliza la PPI transitoria entre IL-6 y gp80. Este es un ejemplo perfecto de PPI transitorias, caracterizadas por velocidades rápidas de asociación y disociación, lo que tiene una consecuencia importante desde un punto de vista inmunológico para controlar la señalización posterior de, p.ej. citoquinas proinflamatorias. La característica clave es que, cuando VHH6 se une al complejo IL-6—gp80, actúa efectivamente como un anticuerpo agonista para IL-6, como lo demuestra la caracterización detallada que va desde la estructura cristalina a las propiedades de unión a la actividad biológica.

VHH6 funciona de manera similar a una trampa entrópica, haciendo que las colisiones entre IL-6 y gp80 sean eficaces a la vez que aumenta la concentración en equilibrio del complejo IL-6-gp80. La hipótesis es que VHH6, al superar el coste entrópico requerido por el sistema para mantener juntos la IL-6 y gp80, permite que el complejo estable formado reclute gp130 y forme el complejo de señalización hexamérico.

La capacidad de VHH6 para alterar la interacción entre IL-6 y gp80 en la conexión de las dos moléculas, sin interferir con el reclutamiento de la pareja de señalización gp130, hizo posible reproducir *in vitro* algunas de las características de la inflamación crónica utilizando células HUVEC.

En el modelo de células HUVEC para la señalización trans de la IL-6, la adición de VHH6 a IL-6 y gp80 simplemente se traduce en una captación más rápida y una mayor acumulación intracelular de IL-6 en las vesículas lisosomales. VHH6 no solo aumentaba significativamente la señal de pSTAT3 en el espacio de 30 minutos del tratamiento, sino que el efecto se extendía a 360 minutos a un nivel significativamente mayor que el logrado con la mezcla de solo IL-6 y gp80.

La fosforilación sostenida de STAT3 se asocia con enfermedades autoinflamatorias, tales como la artritis reumatoide (AR) (Yu, H., Pardoll, D. y Jove, R. "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. Nature reviews". *Cancer* 9, 798-809 (2009)). Para confirmar que la estabilización de IL-6—gp80 conduce *in vitro* a una respuesta proinflamatoria, se comparó el perfil transcriptómico de células HUVEC tratadas con VHH6-IL-6-gp80 con el de células tratadas con IL-6-gp80. La regulación por aumento de genes implicados en la respuesta proinflamatoria estaba directamente relacionada con la duración del tratamiento con VHH6-IL-6-gp80. Además de respaldar los hallazgos de que pSTAT3 se translocaba fácilmente a los núcleos, los genes regulados por aumento estaban ligados a factores de transcripción y reguladores de la actividad de las citoquinas (*NFKB1, CEBPD, JUNB, STAT3, SOCS3*), quinasas de la familia JAK, citoquinas y receptores de citoquinas (*IL-6* y *IL-6ST,* alias gp130) y quimioquinas *(CCL2,* alias proteína quimiotáctica de monocitos 1 o MCP1). Por su relevancia para la enfermedad y los biomarcadores de enfermedad, el más interesante de estos genes es el que codifica MCP1. La MCP1 está regulada por aumento en la sinovia (Koch, A.E. et al. "Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis". *The Journal of clinical investigation* 90, 772-779 (1992)) y en muestras de suero (Hueber, W. et al. "Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines". *Annals of the rheumatic diseases* 66, 712-719 (2007)) de pacientes con RA. Se ha demostrado que la estimulación proinflamatoria de las células HUVEC conduce a la producción de IL-6 y CCL2, contribuyendo ambos a un aumento de la permeabilidad endotelial. Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Kunkel, S.L. y Andjelkovic, A. V. "Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase". *Journal of cell science* 116, 4615-4628 (2003) y Desai, T.R., Leeper, N.J., Hynes, K.L. y Gewertz, B. L. "Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway". *The Journal of surgical research* 104, 118-123 (2002)). Por lo tanto, la manipulación de la señalización de STAT3 usando un anticuerpo de epítopo de conexión parece reflejar la modulación que puede ocurrir en un estado de enfermedad.

VHH6 ofrece un gran potencial en futuros estudios. Debido a su capacidad para estabilizar y modular la interacción entre IL-6 y gp80, VHH6 podría encontrar una aplicación en la comprensión del papel que desempeña la interacción de IL-6 con otras citoquinas o para verificar la hipótesis de que el cambio entre IL-6 (citoquina proinflamatoria) y citoquina antiinflamatoria (p. ej., IL-10), que comparten STAT3 como factor de transcripción, podría deberse a una señal extendida de pSTAT3 (Braun, D.A., Fribourg, M. y Sealfon, S.C. "Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation". *The Journal of biological chemistry* 288, 2986-2993 (2013)). Se podrían explorar las aplicaciones terapéuticas de VHH6 o de una proteína de fusión VHH6-gp80 en sistemas biológicos donde la IL-6 juega un papel como factor de crecimiento. (Galun, E. y Rose-John, S. "The regenerative activity of interleukin-6". *Methods in molecular biology* 982, 59-77 (2013)) p.ej. después de una lesión en la regeneración del hígado (Wuestefeld, T. et al. "Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration". *The Journal of biological chemistry* 278, 11281-11288 (2003)) o activación de células progenitoras similares a hepatocitos (Best, D. H., Butz, G. M. y Coleman, W. B. "Cytokine-dependent activation of small hepatocyte-like progenitor cells in retrorsine-induced rat liver injury". *Experimental and molecular pathology* 88, 7-14 (2010)) y en la expansión de células progenitoras hematopoyéticas (Fischer, M. et al. I. "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion". *Nature biotechnology* 15, 142-145 (1997)). Por último, y particularmente pertinente para fines de descubrimiento de fármacos, VHH6, al fijar juntos IL-6 y gp80, podría ser fundamental para detectar inhibidores más específicos (péptidos, moléculas pequeñas o incluso anticuerpos) del complejo IL-6-gp80, lo que conduciría a una inhibición selectiva de la ruta de señalización trans de la IL-6 en patologías.

En conclusión, los datos generados en este estudio de prueba de concepto demuestran las consecuencias funcionales de manipular la interfaz entre dos proteínas al estabilizar su interacción con un anticuerpo específico del complejo. El uso de anticuerpos, en lugar de construcciones de proteínas de fusión, ofrece la ventaja de proteínas con características fisicoquímicas bien definidas y la capacidad de preservar la conformación correcta del complejo como una unidad funcional. Los anticuerpos de epítopo de conexión como VHH6, que se fijan juntos y estabilizan una PPI transitoria, serían una excelente herramienta para explorar nuevas hipótesis biológicas. En última instancia, esto puede conducir a una forma diferente de abordar el descubrimiento de fármacos y las intervenciones terapéuticas, cuando el objetivo no es una sola molécula sino un complejo multiproteínas.

Ejemplo 2 - Uso de una proteína de unión de conexión en el entrecruzamiento de fusiones de anticuerpos y sus antígenos

Este ejemplo ilustra cómo se puede ensayar el uso de una proteína de unión de conexión para entrecruzar fusiones de dos anticuerpos y, por lo tanto, sus antígenos asociados. Esto se basa en los ensayos descritos en el documento WO 2015/181282 (véase, por ejemplo, los ejemplos 8/9/10). El documento WO 2015/181282 proporciona un ejemplo de direccionamiento biespecífico general que solo proporciona una función cuando se dirigen a ambos marcadores. Los documentos WO 2016/009030 y WO 2016/009029 presentan ejemplos más específicos, donde se dirigen a CD22/CD79 y CD45/CD79.

Método general 1

PBMC humanas derivadas de conos de aféresis de plaquetas se depositan como partes alícuotas congeladas. Antes de realizar un ensayo, las células se descongelan, se lavan en DMEM (Life Technologies) y se dejan aclimatar en un entorno a 37°C y 5% de CO_2.

Método general 2

Fab'A-Componente A (inactiva IL-6) y Fab'B-Componente B (inactiva GP80) se incuban juntos durante 90 minutos (en un entorno a 37°C/5% de CO_2) ya sea en presencia o ausencia del anticuerpo de conexión VHH6 antes de mezclar con 2.5×10^5 PBMC en placas de 96 pocillos con fondo en V. Las PBMC más las combinaciones entrecruzadas (Fab'A-Componente A y Fab'B-Componente B y VHH6) o no entrecruzadas (Fab'A-Componente A y Fab'B-Componente B) después se incuban juntas durante otros 90 minutos. Pasado este tiempo se activan las células B por la adición de $F(ab')_2$ de cabra anti-IgM humana 200 nM (Southern Biotechnology) durante 8 minutos a 37°C. A continuación, la reacción de señalización se detiene añadiendo un volumen igual de tampón Cytofix (BD Biosciences). A continuación, las placas se dejan a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de centrifugarlas a 500 g durante 5 minutos. El exceso de líquido sobrenadante se descarta del sedimento celular que se vuelve a suspender en tampón de flujo y se lava una vez más. Después, las células se vuelven a suspender en tampón Perm III enfriado con hielo (BD Biosciences) durante 30 minutos antes de lavarlas dos veces en el tampón de flujo.

Método general 3

Las células se activan como se describe en el método general 2 y se tiñen con un anticuerpo anti-CD20 marcado con fluorescencia (BD Biosciences), un anticuerpo anti-fosfo Akt que reconoce un resto de serina modificado en la posición 473, un anticuerpo anti-fosfo PLCg2 que reconoce un resto de tirosina modificado en la posición 759 y un anticuerpo anti-IκB que reconoce Iκ**B** total. A continuación, las placas se vuelven a suspender y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de este tiempo, las placas se lavaron dos veces más y se volvieron a suspender en 25 µl de tampón de flujo. La expresión celular de CD20, Akt y PLCg2 se mide utilizando un citómetro de flujo Intellicyt HTFC™

Ejemplo 3 - Generación *in silico* de secuencias humanizadas del anticuerpo VHH6

Se humanizó VHH6 de llama injertando las CDR de la región de VHH de llama en una región armazón de la región VH de anticuerpo de línea germinal humana. También se retuvieron en la secuencia humanizada una serie de restos de la región armazón de la región VHH de llama. Estos restos se seleccionaron utilizando el protocolo descrito por Adair et al. (Humanised antibodies. Documento WO91/09967). Los alineamientos de la secuencia de la región V (donador) del VHH de llama con la secuencia de la región V (aceptor) de la línea germinal humana se muestran en la Figura 18, junto con las secuencias humanizadas diseñadas.

Las CDR injertadas de la secuencia donadora a la aceptora son las definidas por Kabat *et al.* (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 4ª ed, pp. vii-804 (1987)), con la excepción de CDR-H1 donde se usa la definición combinada de Chothia/Kabat (véase Adair et al., 1991 *Humanised antibodies*. WO91/09967). Se eligió la región V humana IGHV3-74 más la región J de IGHJH4 (http://www.imgt.org/) como aceptor de las CDR de VHH. Los restos de la región armazón de la cadena pesada en el injerto gH1 son todos del gen de la línea germinal humana, con la excepción de los restos 4, 24, 37, 44, 45, 46, 47, 49, 71, 78 y 94 (numeración Kabat), donde los restos del donador fenilalanina (F4), treonina (T24), fenilalanina (F37), ácido glutámico (E44), arginina (R45), ácido glutámico (E46), glicina (G47), alanina (A49), glutamina (Q71), valina (V78) y alanina (A94) se mantuvieron, respectivamente.

Lista de secuencias informal

SEQ ID NO: 1 (región variable de la cadena pesada de VHH6)

DVQFVESGGGSVHAGGSLRLNCATSGYIYSTYCMGWFRQAPGKEREGVAHIYTNSGRTYYA
DSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAARPSIRCASFSATEYKDWGQGTQVT
VSS

SEQ ID NO: 2 (CDR1 de VHH6)

GYIYSTYCMG

SEQ ID NO: 3 (CDR2 de VHH6)

HIYTNSGRTYYADSVKG

SEQ ID NO: 4 (CDR3 de VHH6)

RPSIRCASFSATEYKD

SEQ ID NO: 5 (región variable de la cadena pesada de VHH3)

GATGTGCAGTTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCACGCTGGAGGGTCTCTAAGACTCA
ACTGTGCTACCTCTGGATACATTTACAGTACCTATTGCATGGGATGGTTCCGCCAGGCTCC
AGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTCGCACATATTTATACGAATAGTGGACGCACATACTATGCC
GACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCCAAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCGGCCCGTCCCAGTAT
TAGGTGTGCTTCCTTCAGCGCCACCGAATATAAGGACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACC
GTCTCCTCG

SEQ ID NO: 6 (CDR1 de VHH6)

GGATACATTTACAGTACCTATTGCATGGGA

SEQ ID NO: 7 (CDR2 de VHH6)

CATATTTATACGAATAGTGGACGCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGC

SEQ ID NO: 8 (CDR3 de VHH6)

CGTCCCAGTATTAGGTGTGCTTCCTTCAGCGCCACCGAATATAAGGAC

SEQ ID NO: 9 (IL-6 de la Figura 9)

GSAPVPPGED SKDVAAPHRQ PLTSSERIDK QIRYILDGIS ALRKETCNKS
NMCESSKEAL AENNLNLPKM AEKDGCFQSG FNEETCLVKI ITGLLEFEVY
LEYLQNRFES SEEQARAVQM STKVLIQFLQ KKAKNLDAIT TPDPTTNASL
LTKLQAQNQW LQDMTTHLIL RSFKEFLQSS LRALRQM

SEQ ID NO: 10 (gp80 de la Figura 9)

GLAP RRCPAQEVAR GAGAGDVPPE EPQLSCFRKS PLSNVVCEWG
PRSTPSLTTK AVLLVRKFQN SPAEDFQEPC QYSQESQKFS CQLAVPEGDS
SFYIVSMCVA SSVGSKFSKT QTFQGAGILQ PDPPANITVT AVARNPRWLS
VTWQDPHSWN SSFYRLRFEL RYRAERSKTF TTWMVKDLQH HAVIHDAWSG
LRHVVQLRAQ EEFGQGEWSE WSPEAMGTPW TESRSPP

SEQ ID NO: 11-147

Secuencias mostradas en los ejemplos

SEQ ID NO: 147 (región variable de la cadena pesada de VHH6gH1)

EVQFVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYIYSTYCMGWFRQAPGKEREGVAHIYTNSGRTYYA
DSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARPSIRCASFSATEYKDWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 148 (región variable de la cadena pesada de VHH6gH2)

EVQFVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYIYSTYSMGWFRQAPGKEREGVAHIYTNSGRTYYA
DSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARPSIRSASFSATEYKDWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 149 (CDR1 de VHH6gH1)

GYIYSTYCMG

SEQ ID NO: 150 (CDR1 de VHH6gH2)

GYIYSTYSMG

SEQ ID NO: 151 (CDR2 de VHH6gH1 y VHH6gH2)

HIYTNSGRTYYADSVKG

SEQ ID NO: 152 (CDR3 de VHH6gH1)

RPSIRCASFSATEYKD

SEQ ID NO: 153 (CDR3 de VHH6gH2)

RPSIRSASFSATEYKD

SEQ ID NO: 154 (región armazón del aceptor IGHV3-74 IGHJH4 humana)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYA
DSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGQGTLVTVSS

Lista de secuencias

<110> UCB Biofarmacia SPRL

<120> PROTEÍNAS Y USOS

<130> PF0102-WO-PCT

<150> GB1617924.4
<151> 2016-10-24

<160> 154

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VHH6

<400> 1

```
Asp Val Gln Phe Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val His Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Asn Cys Ala Thr Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35                  40                  45

Ala His Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Ala Arg Pro Ser Ile Arg Cys Ala Ser Phe Ser Ala Thr Glu Tyr
            100                 105                 110

Lys Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VHH6

<400> 2

```
Gly Tyr Ile Tyr Ser Thr Tyr Cys Met Gly
1               5                   10
```

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CDR2 de VHH6

<400> 3

```
His Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223 > CDR3 de VHH6

<400> 4

Arg Pro Ser Ile Arg Cys Ala Ser Phe Ser Ala Thr Glu Tyr Lys Asp
1 5 10 15

<210> 5
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VHH6

<400> 5
gatgtgcagt tcgtggagtc tgggggaggc tcggtgcacg ctggagggtc tctaagactc 60

aactgtgcta cctctggata catttacagt acctattgca tgggatggtt ccgccaggct 120

ccagggaagg agcgtgaggg ggtcgcacat atttatacga atagtggacg cacatactat 180

gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccaagaca acgccaagaa cacggtgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccatct attactgtgc ggcccgtccc 300

agtattaggt gtgcttcctt cagcgccacc gaatataagg actggggcca ggggacccag 360

gtcaccgtct cctcg 375

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VHH6

<400> 6
ggatacattt acagtaccta ttgcatggga 30

<210> 7
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VHH6

<400> 7
catatttata cgaatagtgg acgcacatac tatgccgact ccgtgaaggg c 51

<210> 8
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VHH6

<400> 8
cgtcccagta ttaggtgtgc ttccttcagc gccaccgaat ataaggac 48

<210> 9
<211> 187
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
Gly Ser Ala Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala
1               5                  10                  15

Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile
            20                  25                  30

Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn
        35                  40                  45

Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn
    50                  55                  60

Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly
65                  70                  75                  80

Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu
                85                  90                  95

Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu
            100                 105                 110

Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro
    130                 135                 140

Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp
145                 150                 155                 160

Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
            180                 185
```

<210> 10
<211> 231
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Gly Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg Gly Ala
1               5                   10                  15

Gly Ala Gly Asp Val Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg
            20                  25                  30

Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr
        35                  40                  45

Pro Ser Leu Thr Thr Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn
    50                  55                  60

Ser Pro Ala Glu Asp Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe
                85                  90                  95

Tyr Ile Val Ser Met Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser
            100                 105                 110

Lys Thr Gln Thr Phe Gln Gly Ala Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro
        115                 120                 125

Ala Asn Ile Thr Val Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser
    130                 135                 140

Val Thr Trp Gln Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu
145                 150                 155                 160

Arg Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr
                165                 170                 175

Trp Met Val Lys Asp Leu Gln His His Ala Val Ile His Asp Ala Trp
            180                 185                 190

Ser Gly Leu Arg His Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly
        195                 200                 205

Gln Gly Glu Trp Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp
    210                 215                 220

Thr Glu Ser Arg Ser Pro Pro
225                 230
```

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento

<400> 11

```
Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln
1               5
```

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína

<400> 12

Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Cys Phe Asn Glu Glu
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 13

Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
1 5

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 14

Met Val Lys Asp Leu Gln His His Ala Val Ile His Asp
1 5 10

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 15

Arg Ala Leu Arg Gln Met
1 5

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 16

Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 17
<211> 8

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 17

Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr
1 5

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 18

Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser Glu
1 5 10

<210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 19

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr
1 5 10 15

Thr Asn

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 20

Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
1 5 10

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 21

Ala Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val
1 5 10

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 22

```
Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro
1               5                  10                  15

Leu Thr Ser Ser Glu
            20
```

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 23

```
Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr
1               5                  10
```

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 24

```
Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr
1               5                  10
```

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 25

```
Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu
 1              5                  10
```

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

<220>
<223> fragmento

<400> 26

```
Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
1               5                  10
```

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 27

Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 28

Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
1 5 10

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 29

Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
1 5 10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 30

Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu
1 5 10

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

<220>
<223> fragmento

<400> 31

Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala
1 5 10 15

Leu Ala Glu Asn Asn
20

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

<220>
<223> fragmento

<400> 32

Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala
1 5 10 15

<210> 33
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 33

Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met
1 5 10 15

Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln
20

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 34

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn
1 5 10

<210> 35
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 35

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
1 5 10 15

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln
20

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 36

Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 37

Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met
1 5 10

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 38

Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys
1 5 10 15

Phe

<210> 39
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 39

Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe
1 5 10 15

Gln Ser Gly Phe Asn Glu
20

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 40

Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met
1 5

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 41

Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys
1 5 10

<210> 42
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 42

```
Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln
1               5                   10                  15

Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr
            20
```

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 43

```
Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe
1               5
```

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 44

```
Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu
1               5                   10
```

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 45

```
Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
1               5                   10
```

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 46

```
Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu
1               5
```

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 47

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 48

Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu
1 5

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 49

Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 50

Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 51

Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu
1 5 10

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 52

Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 53

```
Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala
1               5                   10                  15

Val Gln Met Ser Thr Lys
            20
```

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 54

```
Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu
1               5                   10
```

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 55

```
Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala
1               5                   10
```

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 56

```
Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala
1               5                   10
```

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 57

```
Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala
1               5
```

<210> 58
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 58

Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
1 5 10

<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 59

Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 60

Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu
1 5

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 61

Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 62

Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu
1 5

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 63

Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala
1 5 10

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 64

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu
1 5

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 65

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala
1 5 10

<210> 66
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 66

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro
1 5 10 15

Thr Thr Asn

<210> 67
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 67

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro
1 5 10 15

Thr Thr Asn Ala
20

<210> 68
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 68

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro
1 5 10 15

Thr Thr Asn Ala Ser Leu
20

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 69

Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr
1 5 10 15

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 70

Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu
1 5 10

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 71

Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 72

Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn
1 5

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 73

Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu
1 5 10

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 74

Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp
1 5 10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 75

Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 76

Gln Asp Met Thr Thr His Leu
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 77

Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 78

Met Thr Thr His Leu Ile Leu
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 79

Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu
1 5

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 80

Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 81

Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu
1 5

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 82

Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu
1 5

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 83

Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu
1 5 10

<210> 84
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 84

```
His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala
1               5                   10                  15

Gln Glu Val Ala Arg
            20
```

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 85

```
Gly Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln
1               5                   10
```

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 86

```
Gly Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu
1               5                   10
```

<210> 87
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 87

```
Gly Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala
1               5                   10
```

<210> 88
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 88

```
Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg Gly Ala Gly Ala Gly Asp Val
1               5                   10                  15

Pro Pro Glu
```

<210> 89
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 89

Ala Gln Glu Val Ala Arg Gly Ala Gly Ala Gly Asp Val Pro Pro Glu
1 5 10 15

Glu Pro Gln Leu Ser Cys
20

<210> 90
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 90

Gln Glu Val Ala Arg Gly Ala Gly Ala Gly Asp Val Pro Pro
1 5 10

<210> 91
<211> 12
<212> **PRT**
<213> Secuencia **Artificial**

<220>
<223> fragmento

<400> 91

Glu Val Ala Arg Gly Ala Gly Ala Gly Asp Val Pro
1 5 10

<210> 92
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 92

Val Ala Arg Gly Ala Gly Ala Gly Asp Val Pro Pro Glu Glu Pro Gln
1 5 10 15

Leu

<210> 93
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 93

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

<210> 94
<211> 19

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 94

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

Leu Ser Asn

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 95

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 96

Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val
1 5

<210> 97
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 97

Lys Ser Pro Leu Ser Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr
1 5 10 15

Pro Ser Leu

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 98

Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu
1 5 10

<210> 99
<211> 12

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 99

Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu
1 5 10

<210> 100
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 100

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

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 101

Thr Thr Lys Ala Val Leu Leu
1 5

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 102

Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 103

Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 104

Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp Phe Gln Glu Pro
1 5 10

<210> 105
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 105

Ala Glu Asp Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys
1 5 10 15

Phe Ser Cys Gln
20

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 106

Asp Phe Gln Glu Pro Cys Gln
1 5

<210> 107
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 107

Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala Val
1 5 10 15

Pro Glu Gly

<210> 108
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 108

Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln Leu Ala Val Pro
1 5 10 15

Glu Gly

<210> 109
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 109

Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln
1 5 10

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 110

Ser Gln Lys Phe Ser Cys Gln
1 5

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 111

Cys Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile
1 5 10

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 112

Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe
1 5 10

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 113

Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe
1 5

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 114

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe
1 5 10

<210> 115
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 115

Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe
1 5

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 116

Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
1 5 10

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 117

Ala Asn Ile Thr Val Thr Ala Val Ala Arg
1 5 10

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 118

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 119
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 119

Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp
1 5

<210> 120
<211> 7

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 120

Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp
1 5

<210> 121
<211> 10
<212> **PRT**
<213> Secuencia **Artificial**

<220>
<223> fragmento

<400> 121

Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val
1 5 10

<210> 122
<211> 11
<212> **PRT**
<213> Secuencia **Artificial**

<220>
<223> fragmento

<400> 122

Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr
1 5 10

<210> 123
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 123

Thr Trp Gln Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe
1 5 10

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 124

Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe
1 5

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 125

Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu
1 5

<210> 126
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 126

Glu Leu Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr
1 5 10

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 127

Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr
1 5

<210> 128
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 128

Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp Leu Gln His
1 5 10

<210> 129
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 129

Met Val Lys Asp Leu Gln His His Ala Val Ile His Asp Ala Trp Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 130
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 130

Met Val Lys Asp Leu Gln His His Ala Val Ile His Asp Ala Trp Ser
1 5 10 15

Gly Leu Arg His Val Val Gln Leu
20

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 131

Ser Gly Leu Arg His Val Val Gln Leu
1 5

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 132

Leu Arg His Val Val Gln Leu
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 133

Arg His Val Val Gln Leu Arg Ala
1 5

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 134

Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu
1 5 10

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 135

Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp
1 5 10

<210> 136
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 136

Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met
1 5 10 15

Gly Thr Pro

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 137

Gly Gln Gly Glu Trp Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro
1 5 10 15

Trp

<210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 138

Trp Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala
1 5

<210> 139
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 139

Trp Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu
1 5 10 15

<210> 140
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 140

Trp Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser
1 5 10 15

Arg Ser Pro Pro 20

<210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 141

```
Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala
1               5
```

<210> 142
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 142

```
Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu
1               5                   10
```

<210> 143
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 143

```
Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg
1               5                   10                  15

Ser Pro Pro
```

<210> 144
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 144

```
Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu
1               5                   10
```

<210> 145
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 145

```
Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser Pro Pro
1               5                   10                  15
```

<210> 146
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> fragmento

<400> 146

```
Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu
1               5
```

<210> 147
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hVHH6

<400> 147

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35                  40                  45

Ala His Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Pro Ser Ile Arg Cys Ala Ser Phe Ser Ala Thr Glu Tyr
            100                 105                 110

Lys Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 148
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hVHH6

<400> 148

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Tyr Ile Tyr Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35                  40                  45

Ala His Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Pro Ser Ile Arg Ser Ala Ser Phe Ser Ala Thr Glu Tyr
            100                 105                 110

Lys Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 149
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hVHH6

<400> 149

```
Gly Tyr Ile Tyr Ser Thr Tyr Cys Met Gly
1               5                   10
```

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hVHH6

<400> 150

```
Gly Tyr Ile Tyr Ser Thr Tyr Ser Met Gly
1               5                   10
```

<210> 151
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hVHH6

<400> 151

His Ile Tyr Thr Asn Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 152
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hVHH6

<400> 152

Arg Pro Ser Ile Arg Cys Ala Ser Phe Ser Ala Thr Glu Tyr Lys Asp
1 5 10 15

<210> 153
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> hVHH6

<400> 153

Arg Pro Ser Ile Arg Ser Ala Ser Phe Ser Ala Thr Glu Tyr Lys Asp
1 5 10 15

<210> 154
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 154

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un anticuerpo específico para un epítopo de conexión creado por una interacción proteína:proteína transitoria, cuyo anticuerpo estabiliza la interacción proteína:proteína, comprendiendo dicho método:

(i) inmunizar a un animal con una proteína de fusión de la interacción proteína:proteína transitoria estabilizada;

(ii) seleccionar un anticuerpo que interaccione con el complejo estabilizado de la interacción proteína:proteína pero no con cada componente individual de la interacción proteína:proteína en ausencia del otro; y

(iii) determinar que el anticuerpo estabiliza la interacción proteína:proteína.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona si

(a) no tiene unión detectable a cada componente individual de la interacción proteína:proteína en ausencia del otro; y/o

(b) tiene una constante de disociación (K_D) para unirse a la interacción proteína:proteína que es al menos 10 veces menor que la K_D para unirse a cada componente proteína individual de la interacción proteína:proteína.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los dos componentes de la interacción proteína:proteína transitoria tienen una velocidad de disociación (k_{off}) en ausencia del anticuerpo mayor que 0.01 s^{-1}

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo se selecciona si, en presencia del anticuerpo, los dos componentes de la interacción proteína:proteína transitoria tienen una velocidad de disociación (k_{off}) menor que 0.01 s^{-1}.

5. El método de las reivindicaciones 3 o 4, en donde la k_{off} se mide por resonancia de plasmón de superficie a 25°C.

6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se une específicamente en o sobre la conexión creada cuando los dos componentes proteínas de una interacción proteína:proteína transitoria forman un complejo, y no reconoce un sitio creado cuando los dos componentes proteínas de la interacción proteína:proteína se unen y que se encuentra lejos de la interfaz proteína:proteína.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona si se une a un epítopo que se extiende a lo largo de la interfaz entre los dos componentes proteínas del complejo de interacción proteína:proteína.

8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho animal es un camello y dicho anticuerpo es un anticuerpo VHH.

9. El método de la reivindicación 1, en donde en dicha proteína de fusión uno de los componentes proteínas de la interacción proteína:proteína se fusiona directamente sobre el extremo de la otra proteína.

10. El método de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona si la velocidad de disociación (k_{off}) para la interacción proteína:proteína transitoria se reduce al menos 10 veces.

11. El método de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona si la constante de disociación (K_D) para la interacción proteína:proteína se reduce al menos 10 veces.

12. El método de la reivindicación 1, en donde la región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo o fragmento del mismo tiene interacciones con ambas proteínas de la interacción proteína:proteína, la región variable de la cadena ligera (V_L) tiene interacciones con ambas proteínas de la interacción proteína:proteína, o tanto V_H como V_L tienen interacciones con ambas proteínas de la interacción proteína:proteína

13. El método de la reivindicación 12, en donde una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) individuales de la V_H y/o V_L del anticuerpo interaccionan con ambos componentes de la interacción proteína:proteína.

14. El método de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un Fab, scFv o VHH

Figura 1

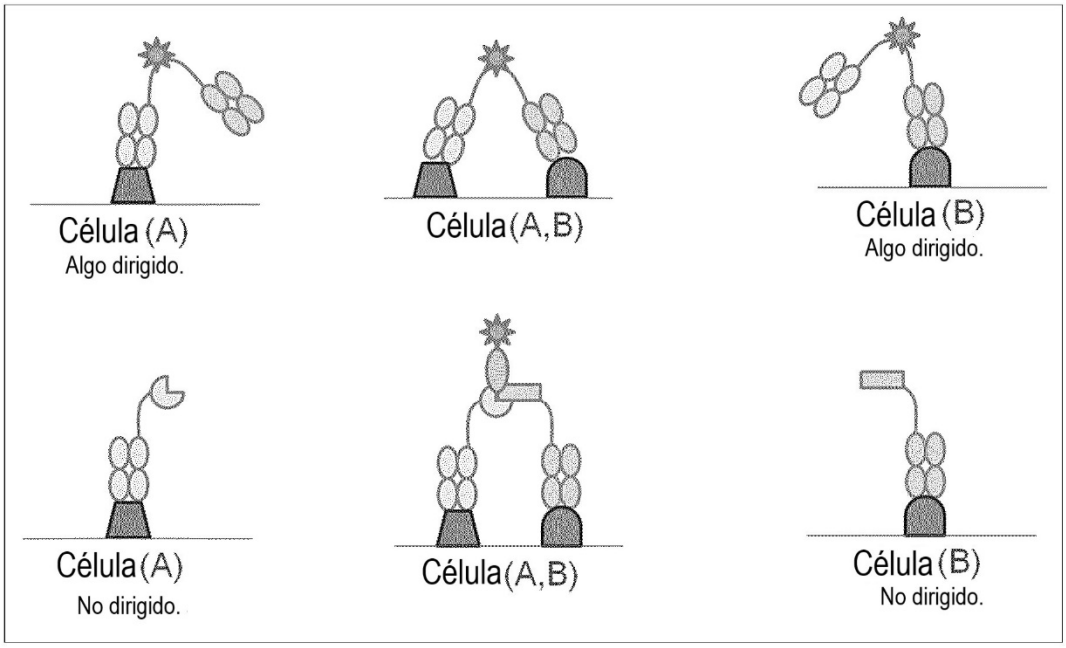


Figura 2

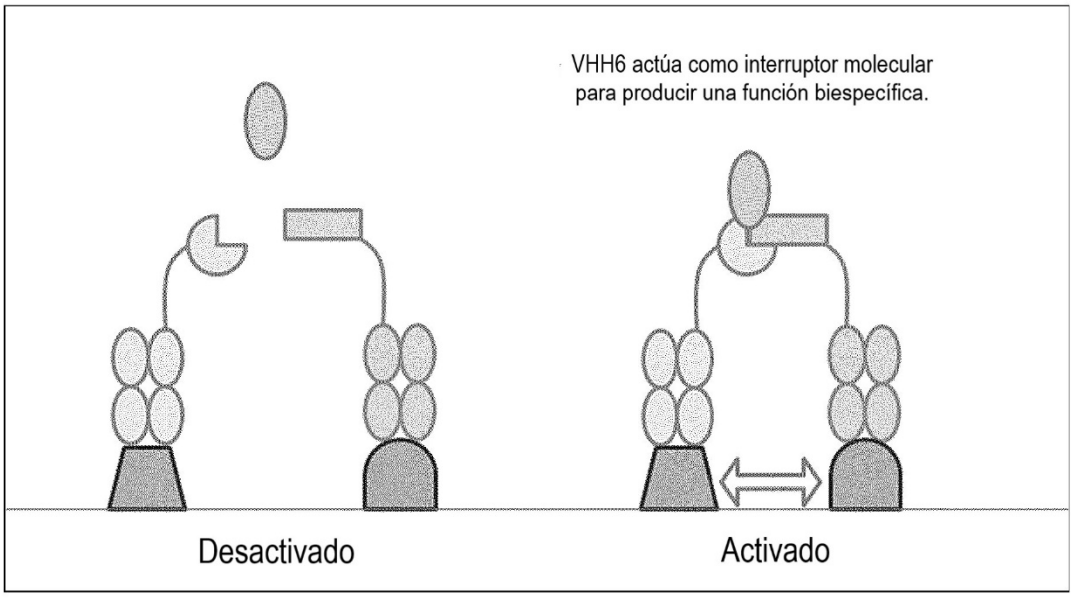


Figura 3

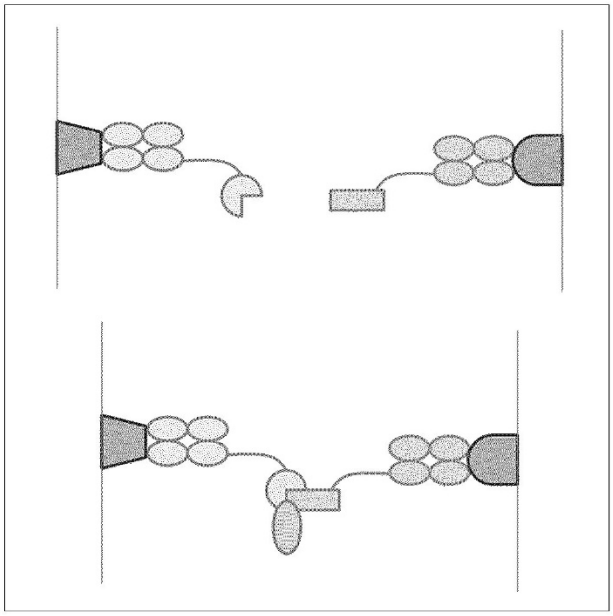


Figura 4

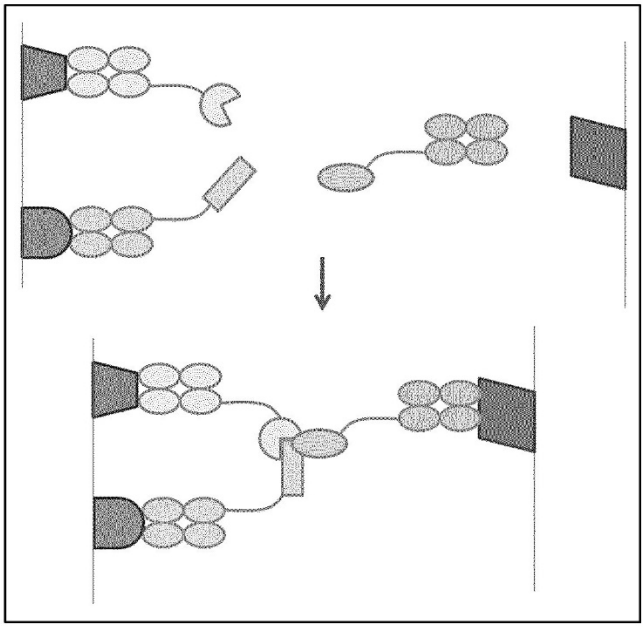


Figura 5

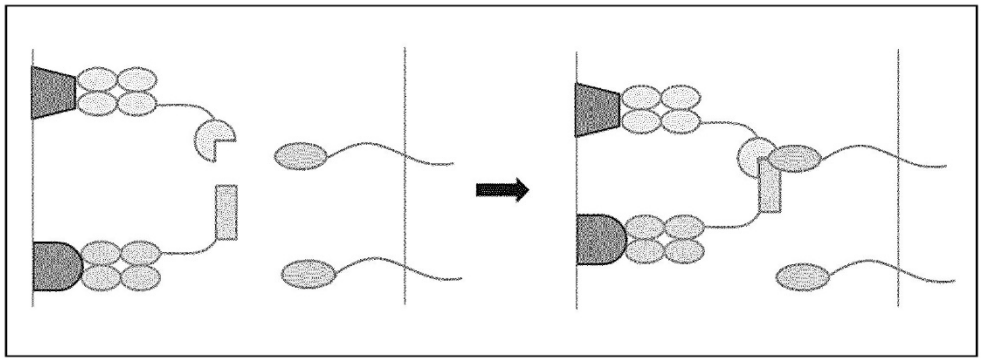


Figura 6

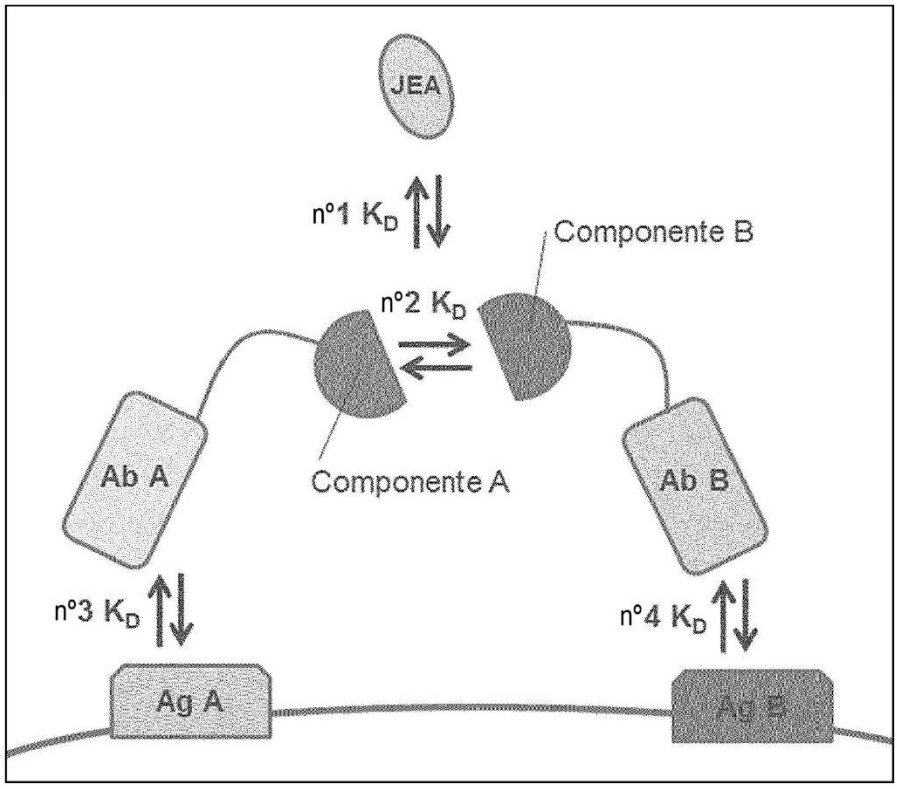
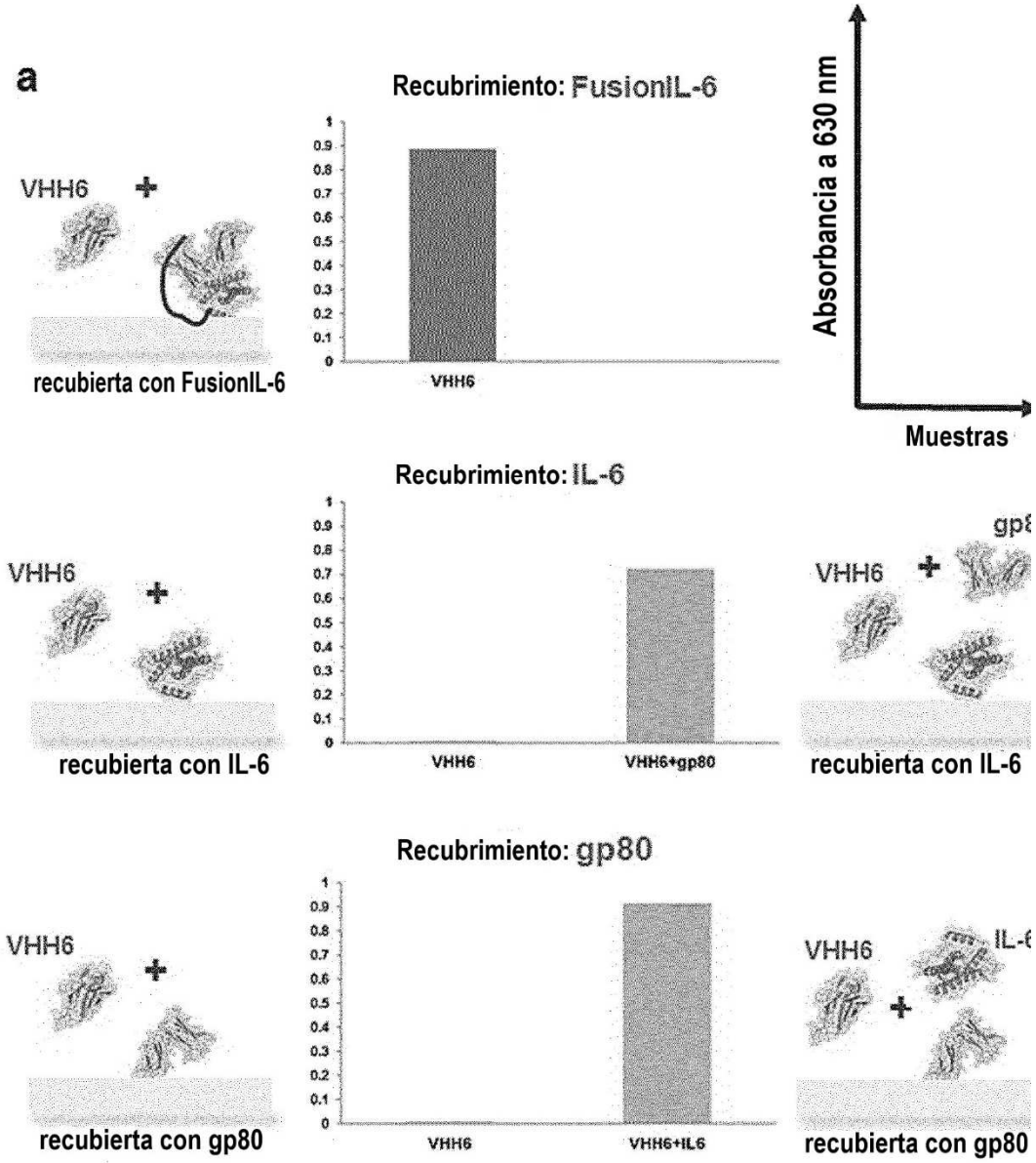
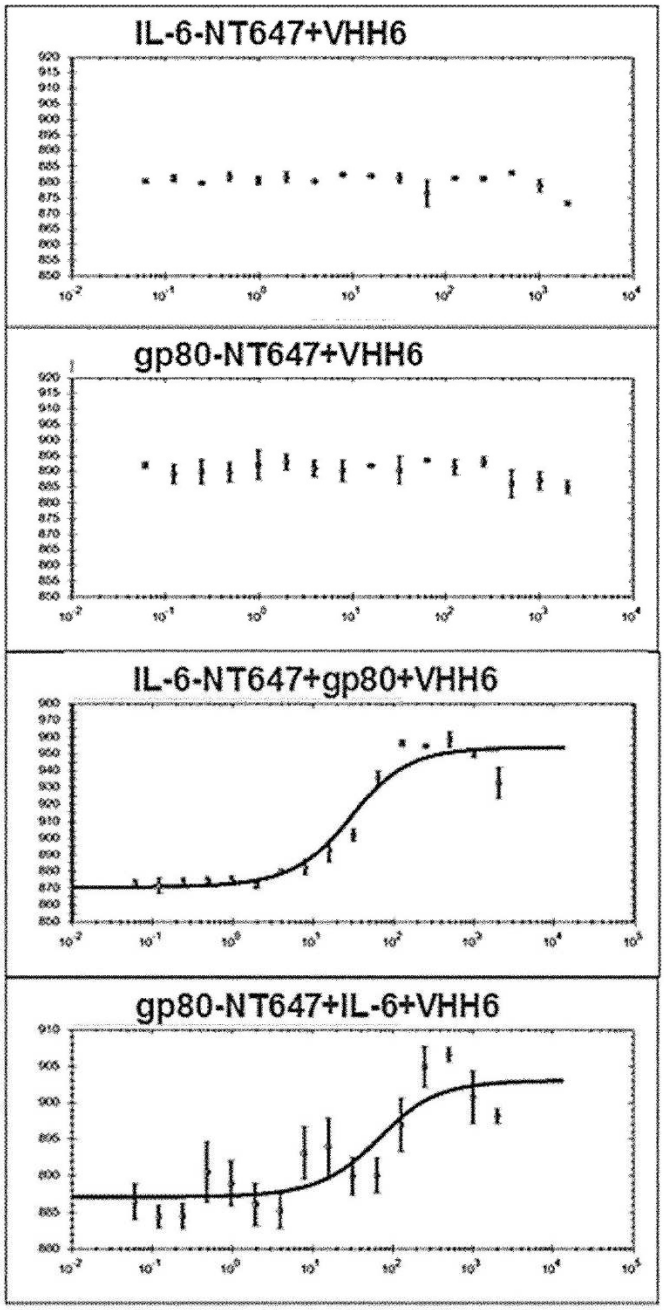
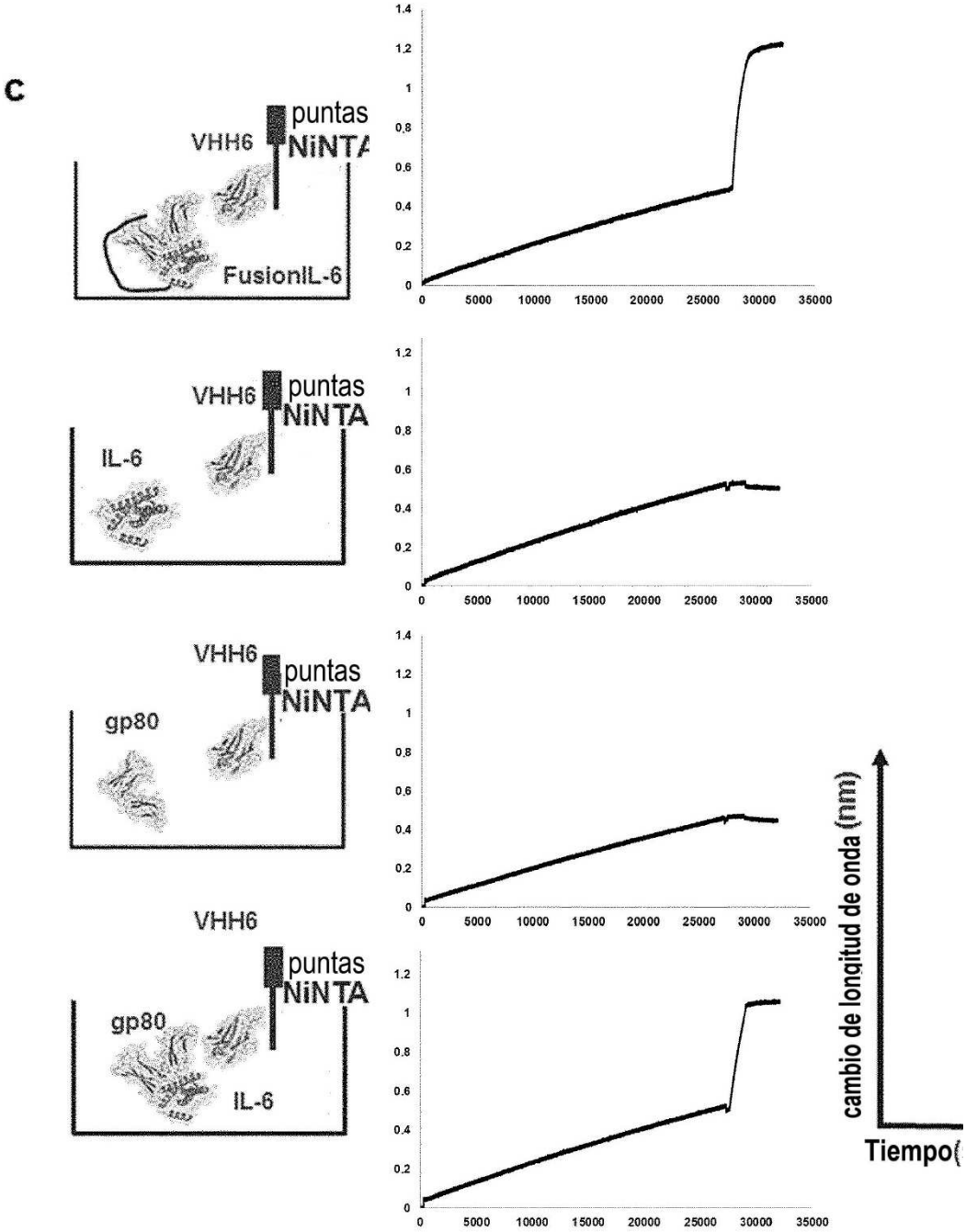


Figura 7


a
Recubrimiento: FusionIL-6
VHH6
recubierta con FusionIL-6
VHH6
Absorbancia a 630 nm
Muestras
Recubrimiento: IL-6
VHH6
recubierta con IL-6
VHH6
VHH6+gp80
VHH6
recubierta con IL-6
Recubrimiento: gp80
VHH6
recubierta con gp80
VHH6
VHH6+IL6
VHH6
recubierta con gp80

b


IL-6-NT647+VHH6
gp80-NT647+VHH6
IL-6-NT647+gp80+VHH6
gp80-NT647+IL-6+VHH6
Termoforesis sin salto
Conc.


C
VHH6
puntas
NiNTA
FusionIL-6
IL-6
gp80
cambio de longitud de onda (nm)
Tiempo(

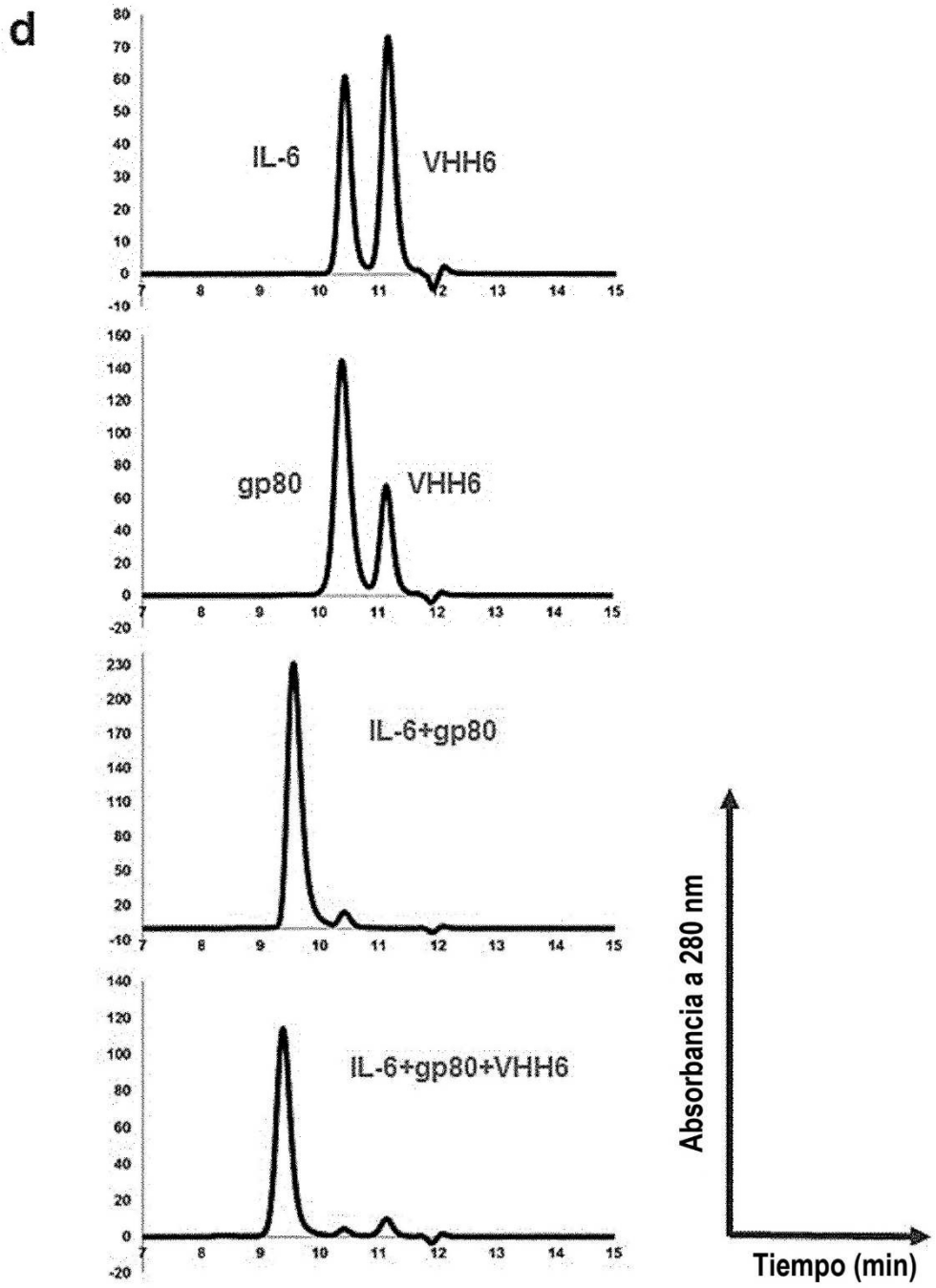
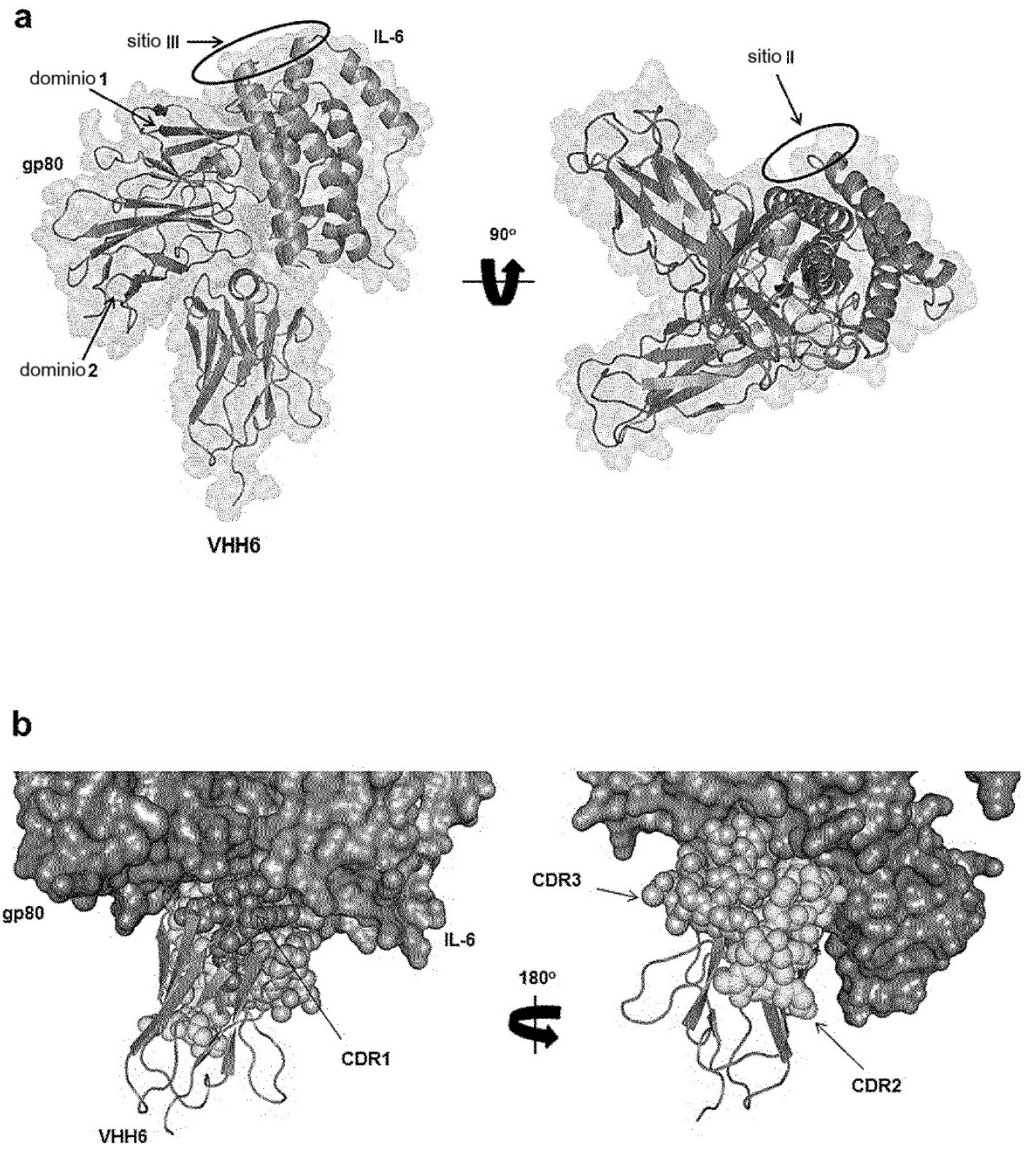
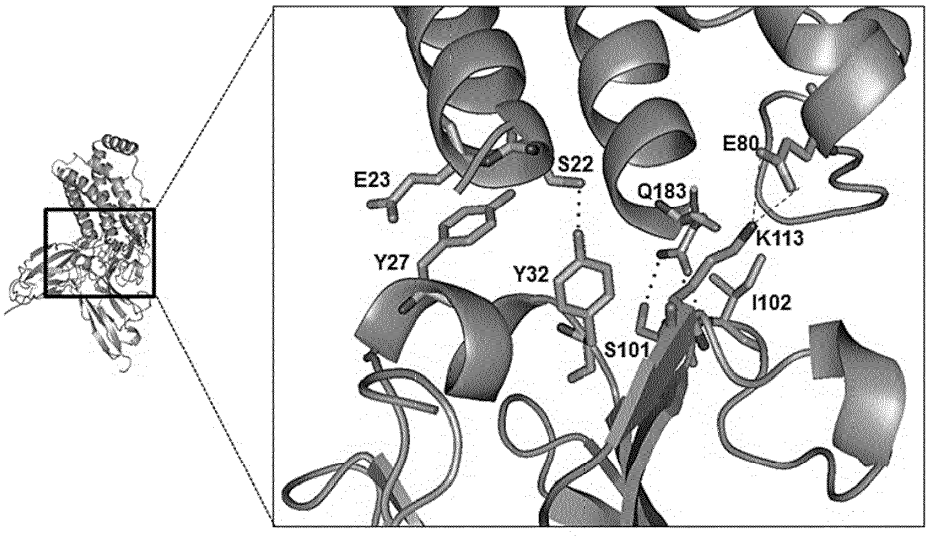

d
IL-6
VHH6
gp80
VHH6
IL-6+gp80
IL-6+gp80+VHH6
Absorbancia a 280 nm
Tiempo (min)

Figura 8


a
sitio III
IL-6
dominio 1
gp80
dominio 2
VHH6
90º
sitio II
b
gp80
IL-6
CDR1
VHH6
180º
CDR3
CDR2

c


E23
S22
E80
Q183
K113
Y27
Y32
I102
S101

d

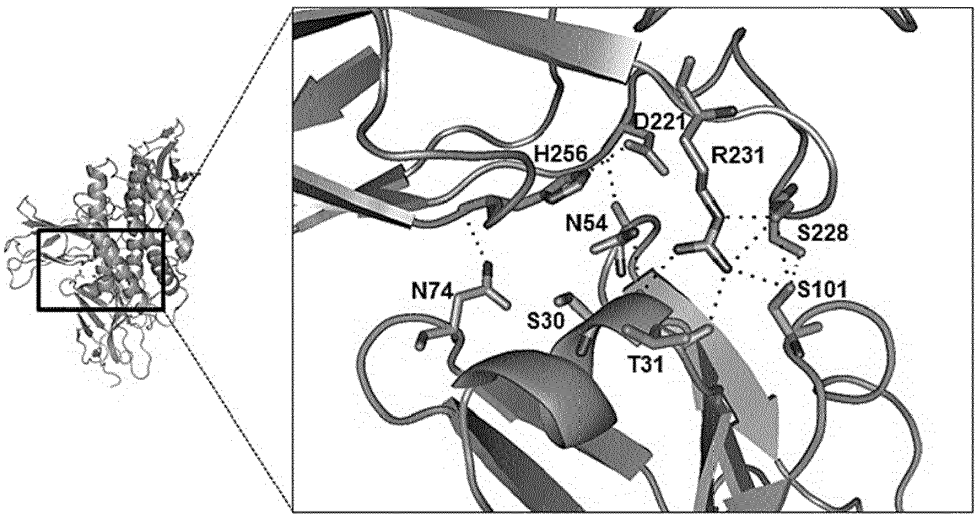
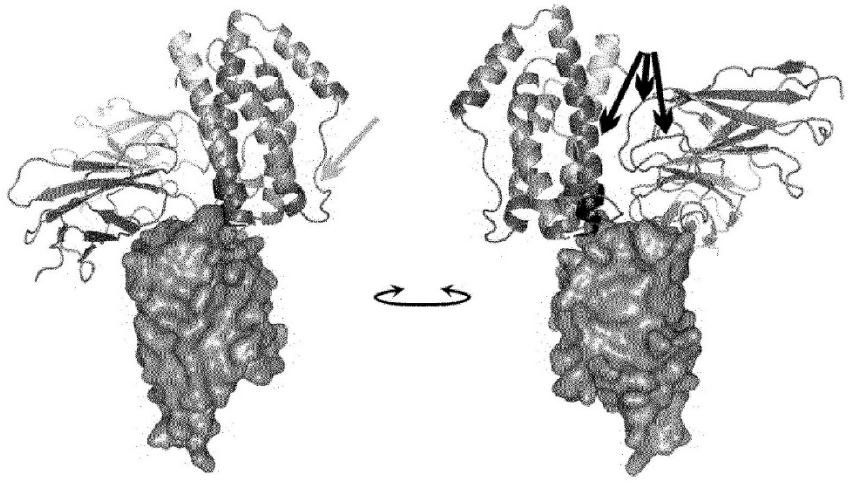

D221
H256
R231
N54
S228
N74
S101
S30
T31

Figura 9

a



b

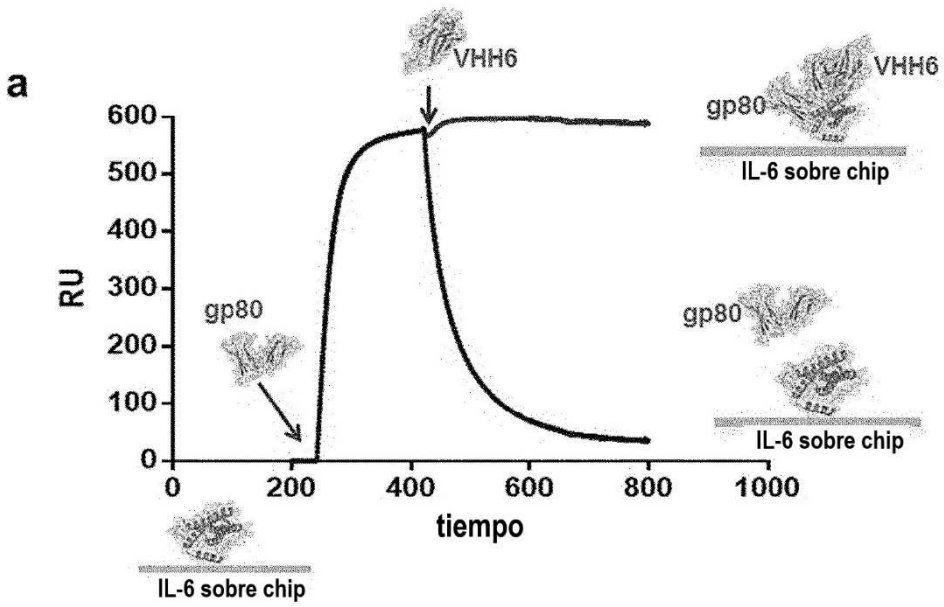
IL-6

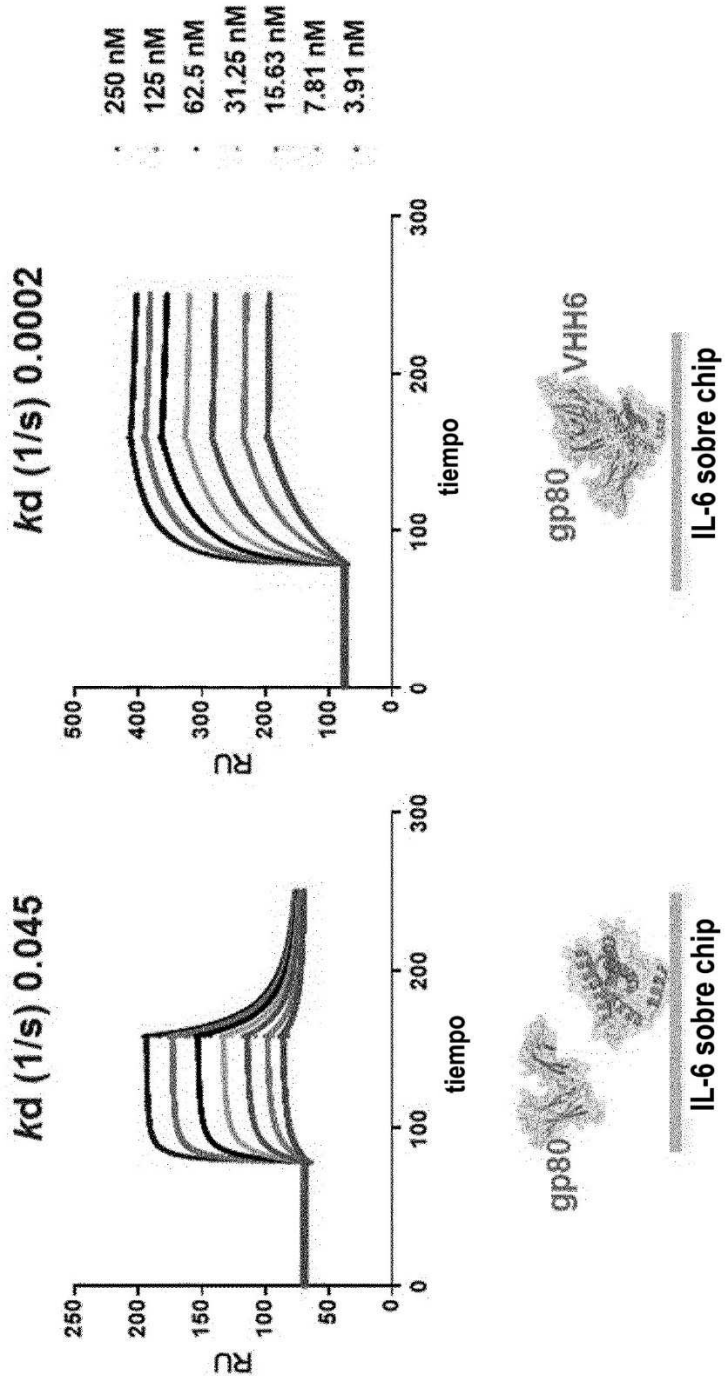
```
  1 GSAPVPPGED SKDVAAPHRQ PLTSSERIDK QIRYILDGIS ALRKETCNKS
 51 NMCESSKEAL AENNLNLPKM AEKDGCFQSG FNEETCLVKI ITGLLEFEVY
101 LEYLQNRFES SEEQARAVQM STKVLIQFLQ KKAKNLDAIT TPDPTTNASL
151 LTKLQAQNQW LQDMTTHLIL RSFKEFLQSS LRALRQM
```

gp80

```
 17       GLAP RRCPAQEVAR GAGAGDVPPE EPQLSCFRKS PLSNVVCEWG
 61 PRSTPSLTTK AVLLVRKFQN SPAEDFQEPC QYSQESQKFS CQLAVPEGDS
111 SFYIVSMCVA SSVGSKFSKT QTFQGAGILQ PDPPANITVT AVARNPRWLS
161 VTWQDPHSWN SSFYRLRFEL RYRAERSKTF TTWMVKDLQH HAVIHDAWSG
211 LRHVVQLRAQ EEFGQGEWSE WSPEAMGTPW TESRSPP
```

Figura 10


a
VHH6
gp80
IL-6 sobre chip
RU
600
500
400
300
200
100
0
0
200
400
600
800
1000
tiempo


250 nM
125 nM
62.5 nM
31.25 nM
15.63 nM
7.81 nM
3.91 nM
kd (1/s) 0.0002
kd (1/s) 0.045
RU
tiempo
gp80
VHH6
IL-6 sobre chip

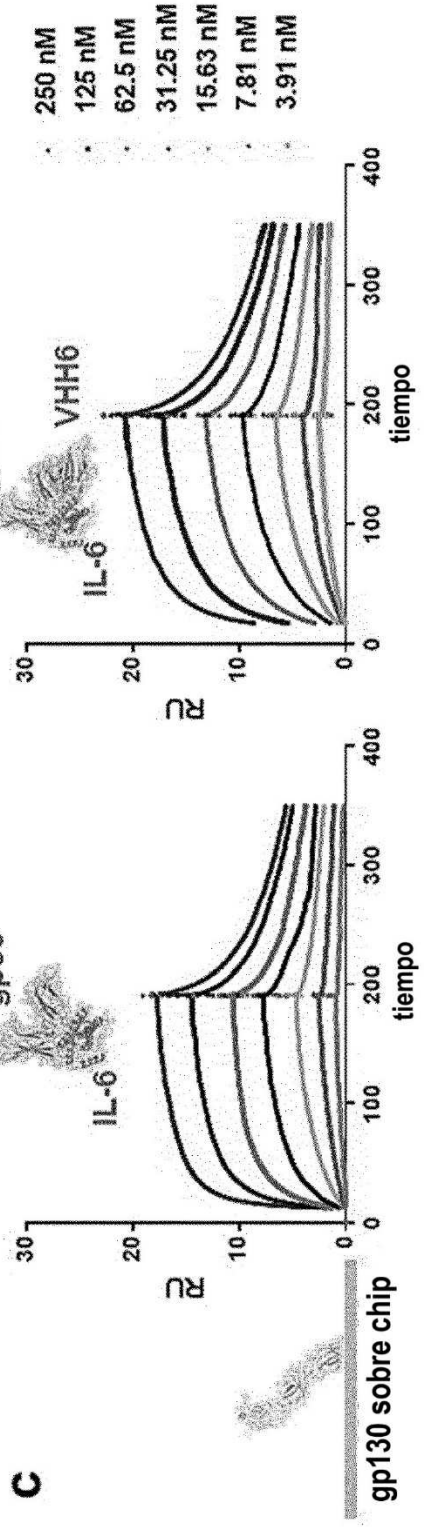
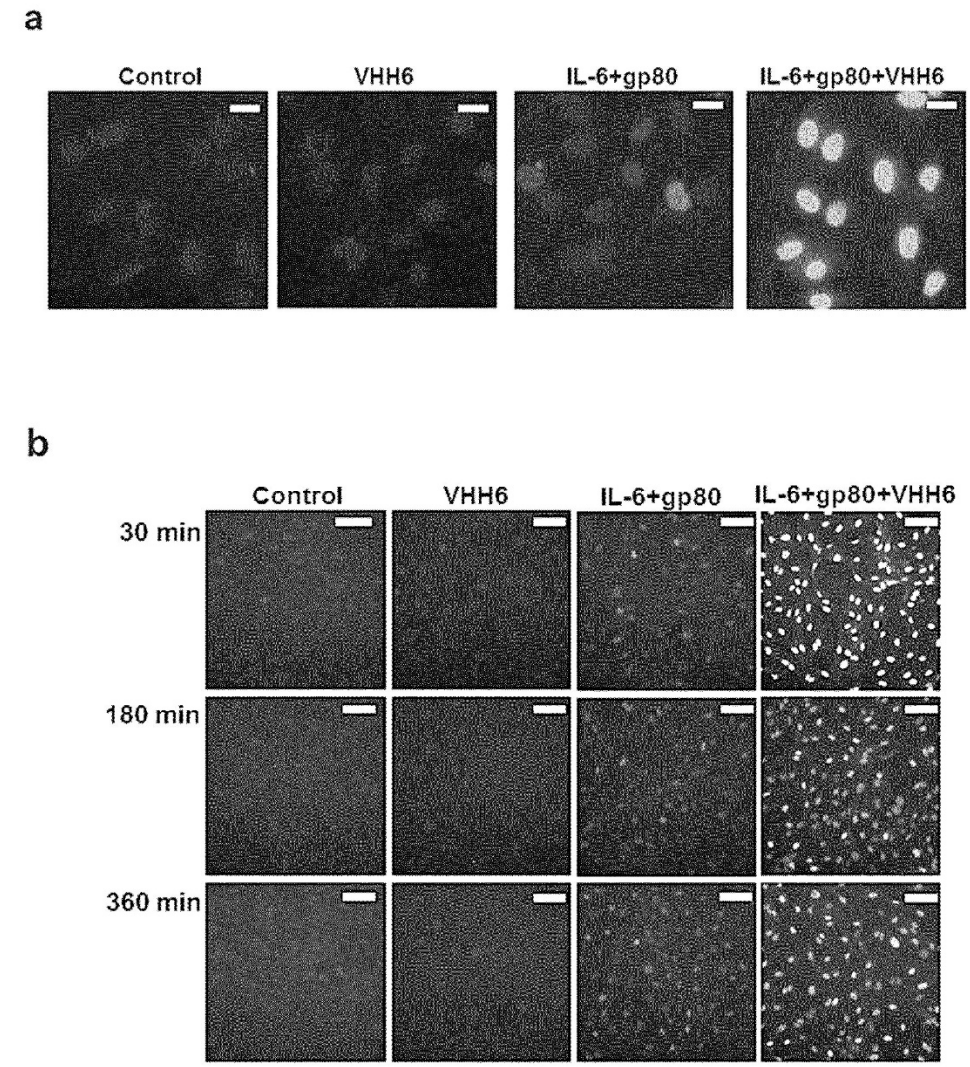
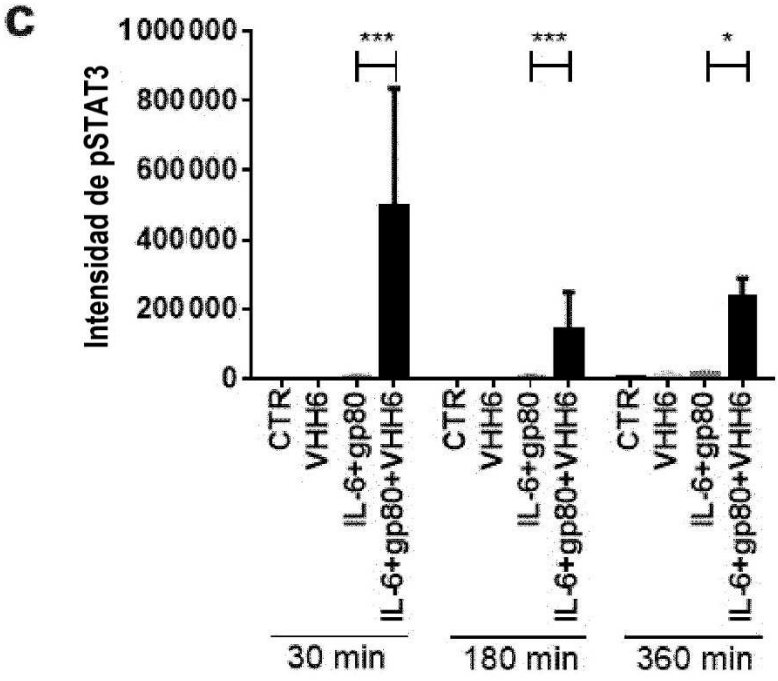
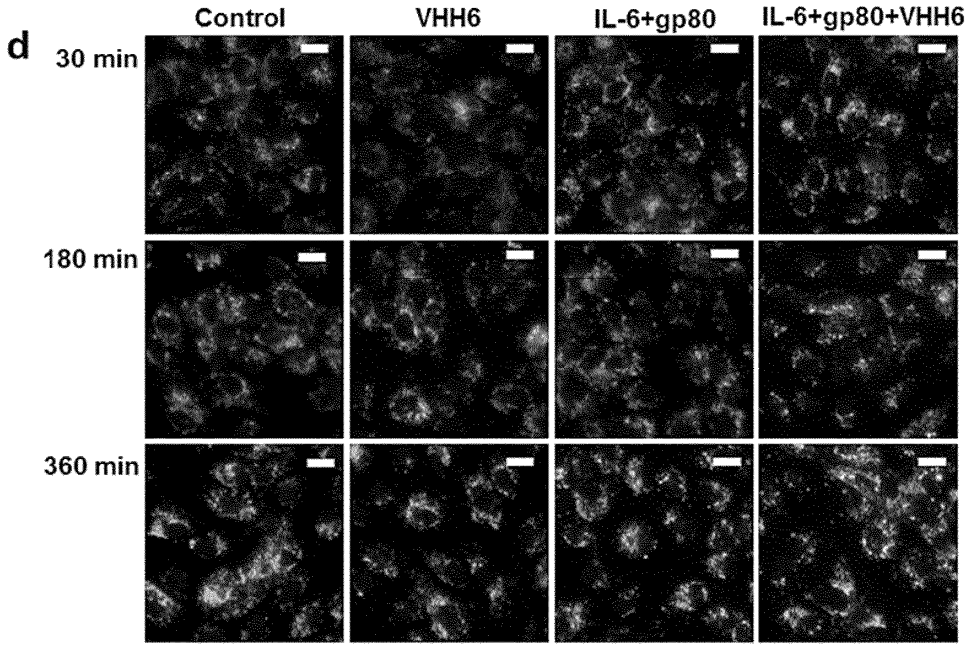
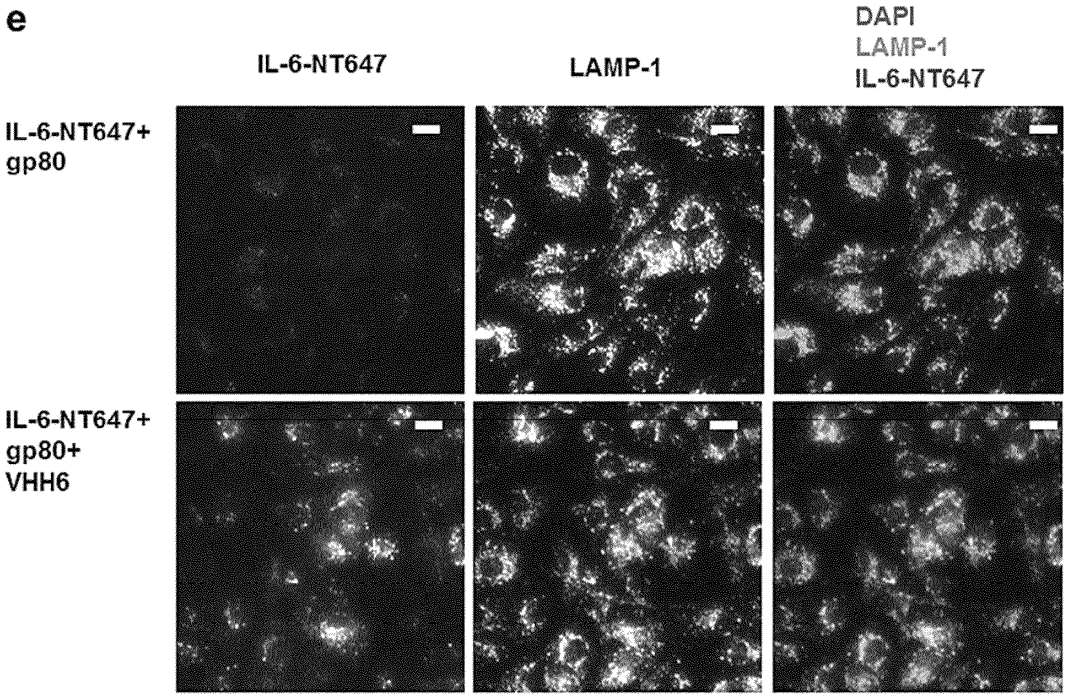

C
gp130 sobre chip
gp80
IL-6
RU
tiempo
gp80
IL-6
VHH6
RU
tiempo
250 nM
125 nM
62.5 nM
31.25 nM
15.63 nM
7.81 nM
3.91 nM

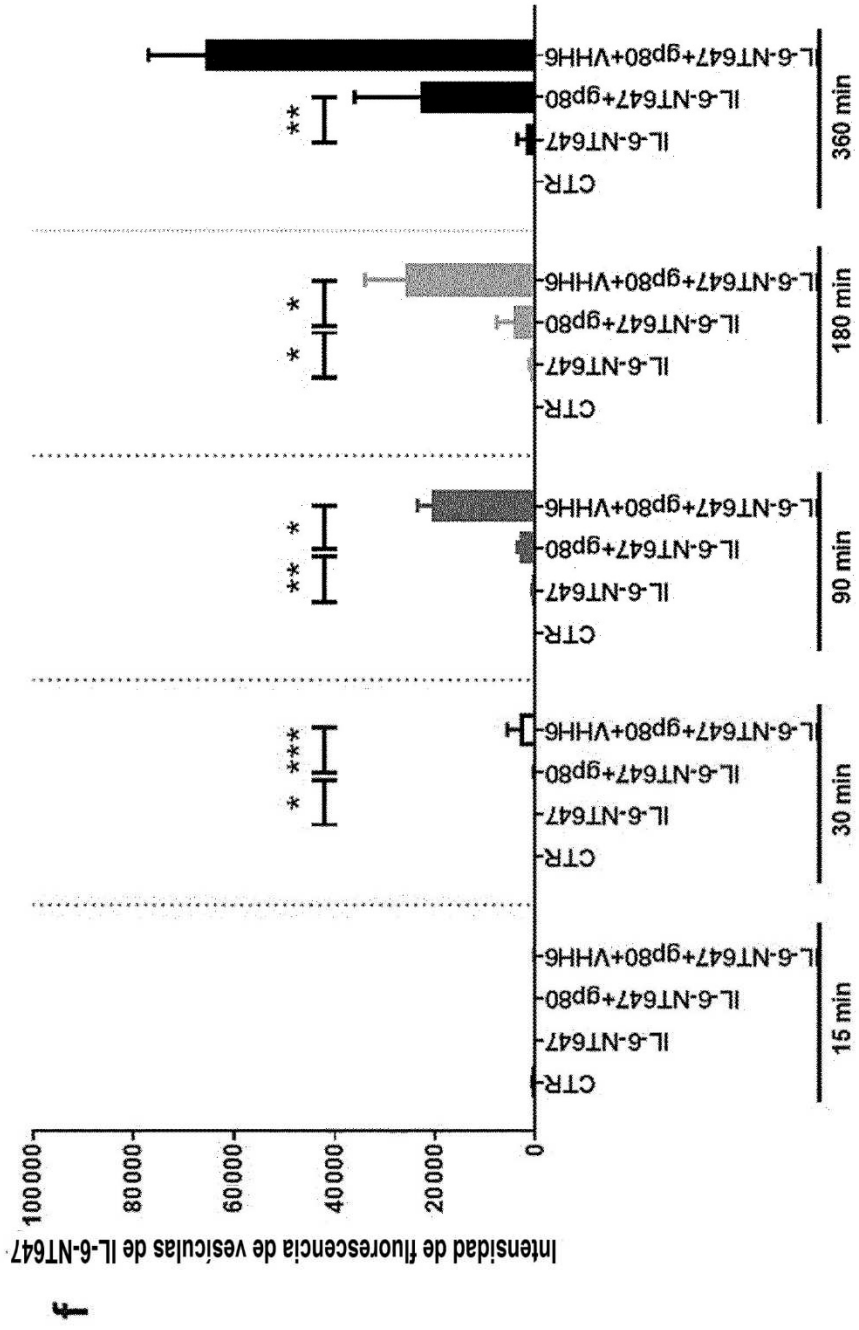
Figura 11


a
Control
VHH6
IL-6+gp80
IL-6+gp80+VHH6
b
Control
VHH6
IL-6+gp80
IL-6+gp80+VHH6
30 min
180 min
360 min


C
Intensidad de pSTAT3
1000000
800000
600000
400000
200000
0
***
***
*
CTR
VHH6
IL-6+gp80
IL-6+gp80+VHH6
30 min
180 min
360 min

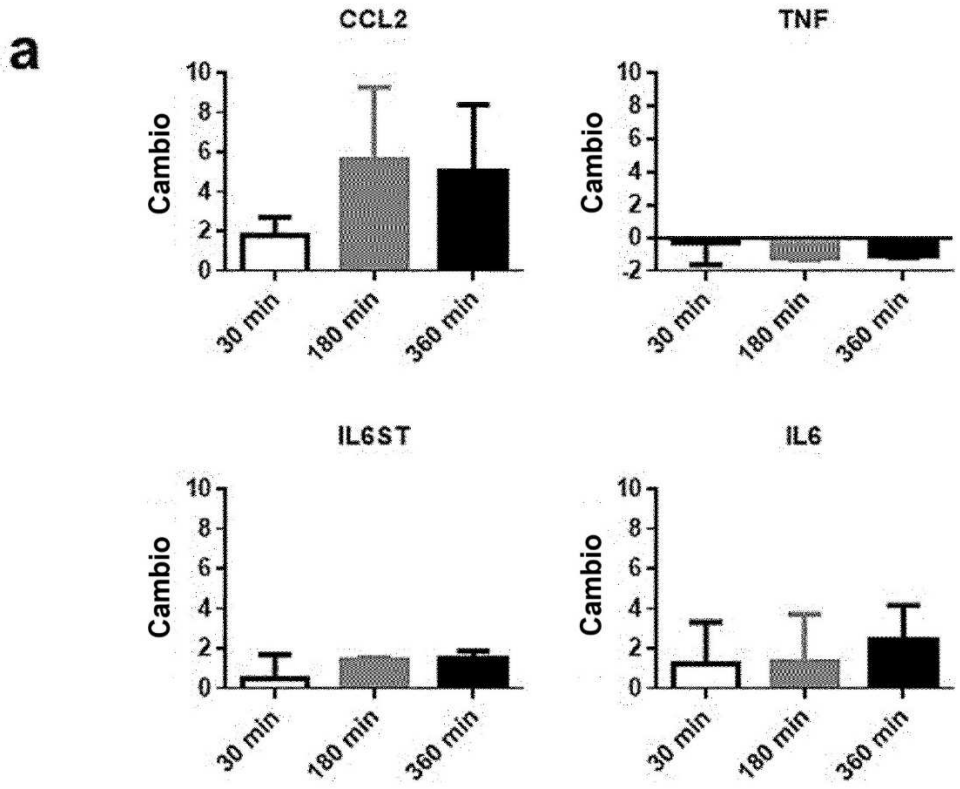

d
Control
VHH6
IL-6+gp80
IL-6+gp80+VHH6
30 min
180 min
360 min

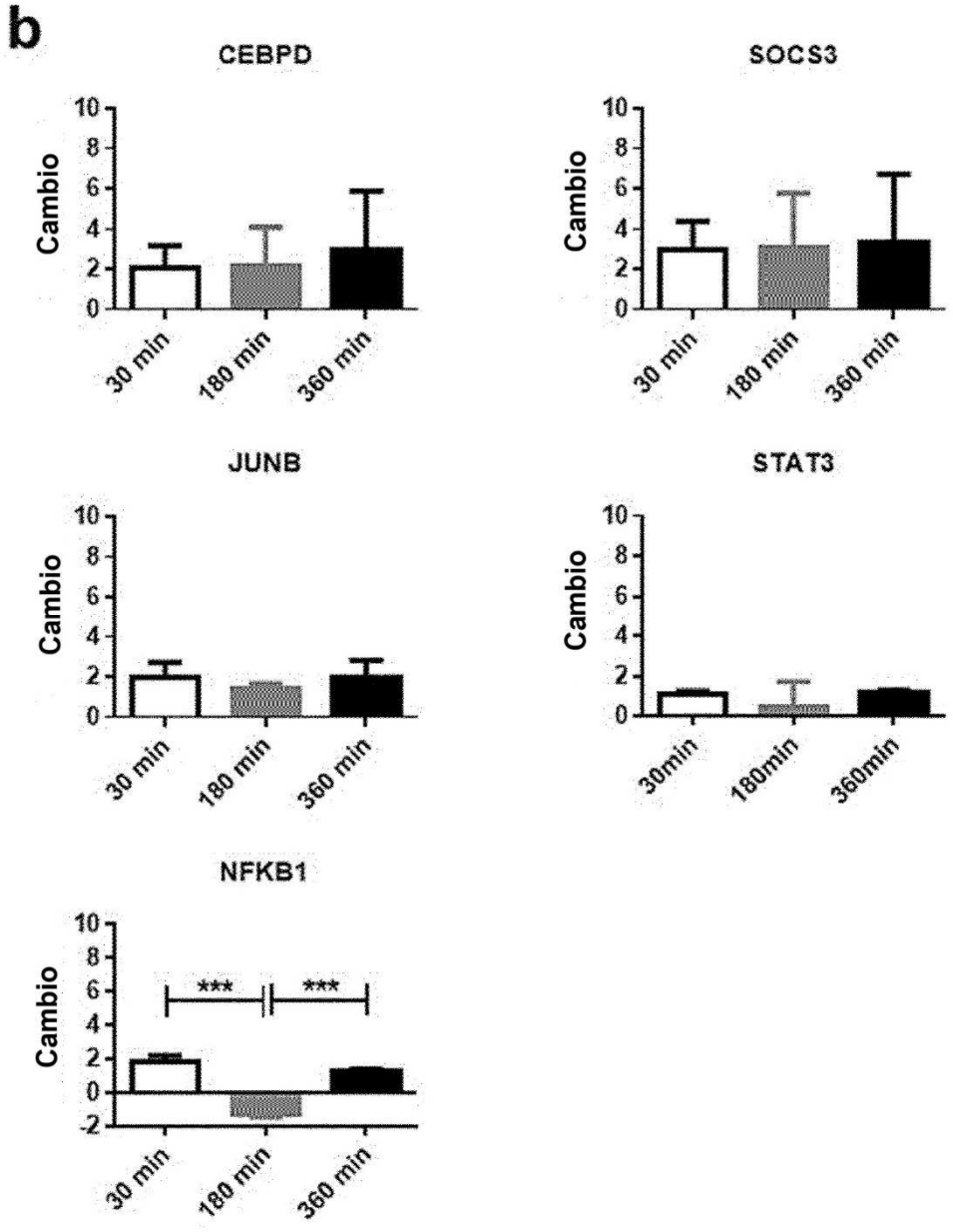

e
IL-6-NT647
LAMP-1
DAPI
LAMP-1
IL-6-NT647
IL-6-NT647+
gp80
IL-6-NT647+
gp80+
VHH6


Intensidad de fluorescencia de vesículas de IL-6-NT647
100 000
80 000
60 000
40 000
20 000
0
15 min
30 min
90 min
180 min
360 min
CTR
IL-6-NT647
IL-6-NT647+gp80
IL-6-NT647+gp80+VHH6
*
**
***

f

Figura 12




b
CEBPD
SOCS3
JUNB
STAT3
NFKB1
Cambio
30 min
180 min
360 min
30min
180min
360min
***
***

C

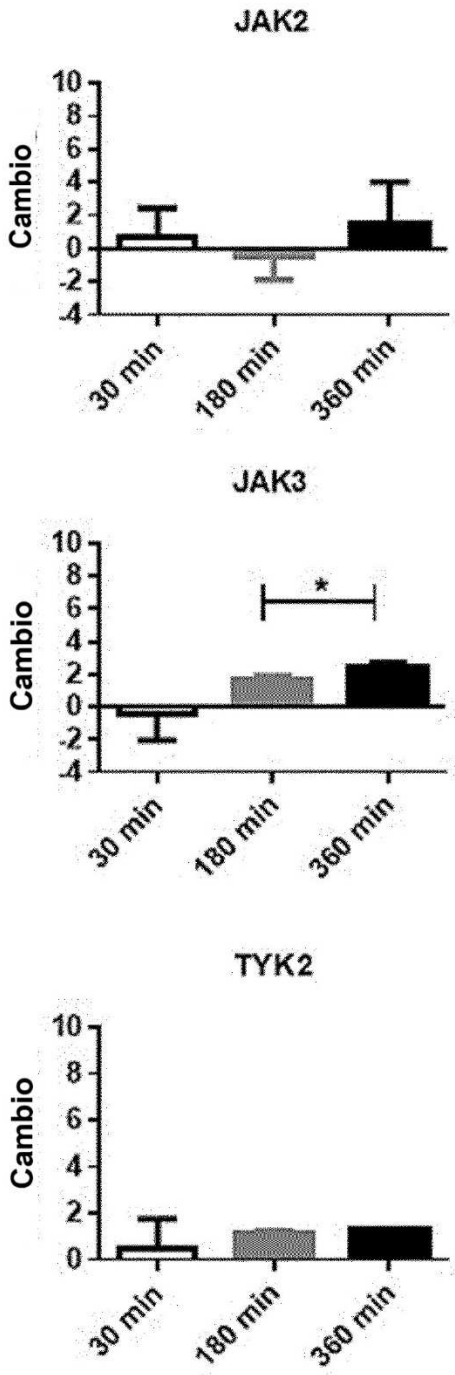

JAK2
Cambio
10
8
6
4
2
0
-2
-4
30 min
180 min
360 min
JAK3
Cambio
*
10
8
6
4
2
0
-2
-4
30 min
180 min
360 min
TYK2
Cambio
10
8
6
4
2
0
30 min
180 min
360 min

Figura 13

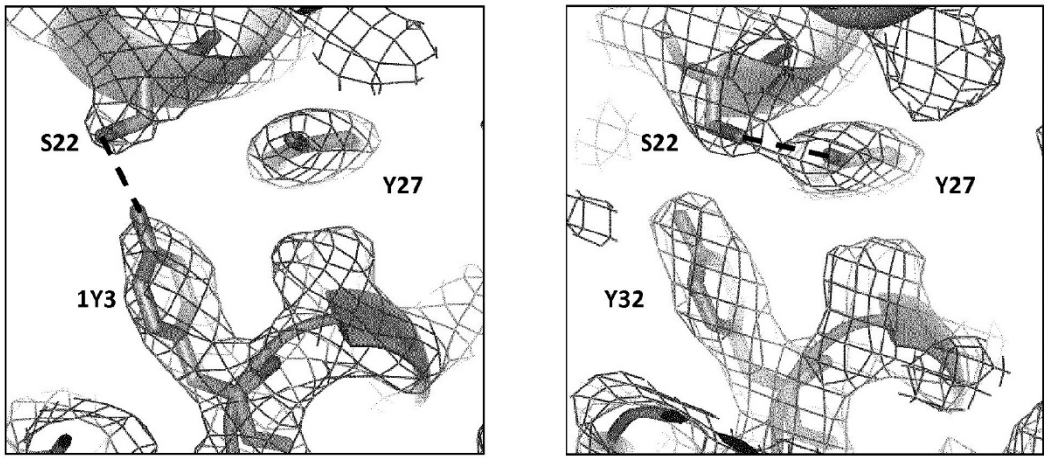


Figura 14

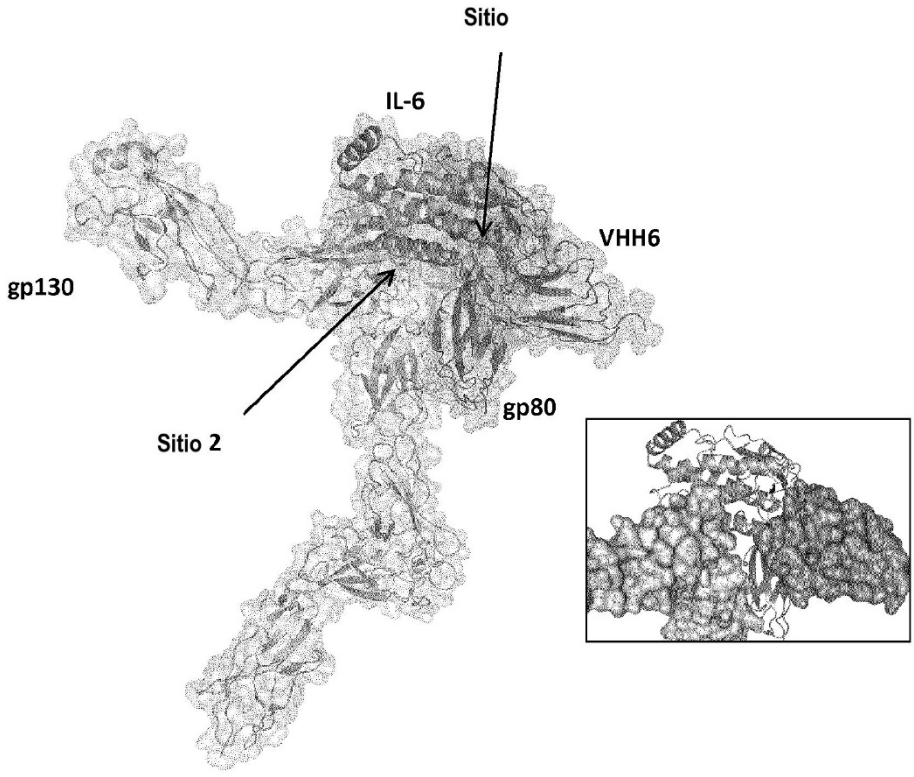


Figura 15

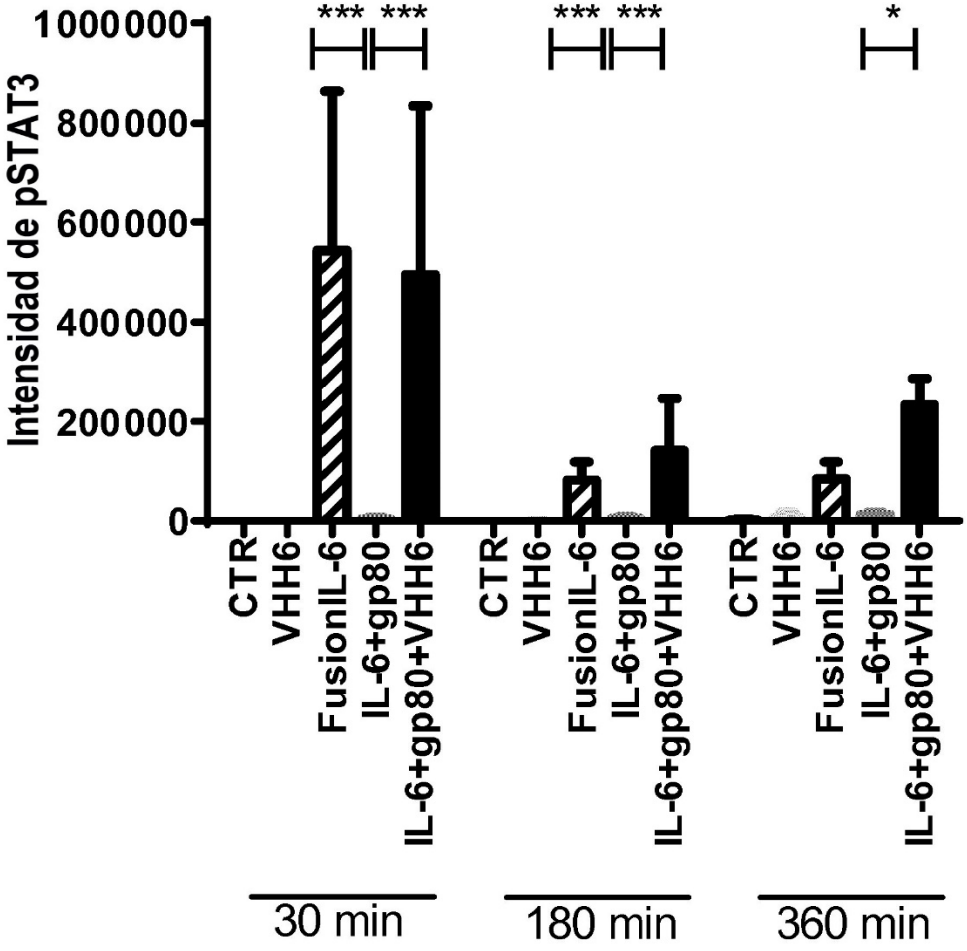

Intensidad de pSTAT3
1000000
800000
600000
400000
200000
0
*** ***
*** ***
*
CTR
VHH6
FusionIL-6
IL-6+gp80
IL-6+gp80+VHH6
30 min
180 min
360 min

Figura16

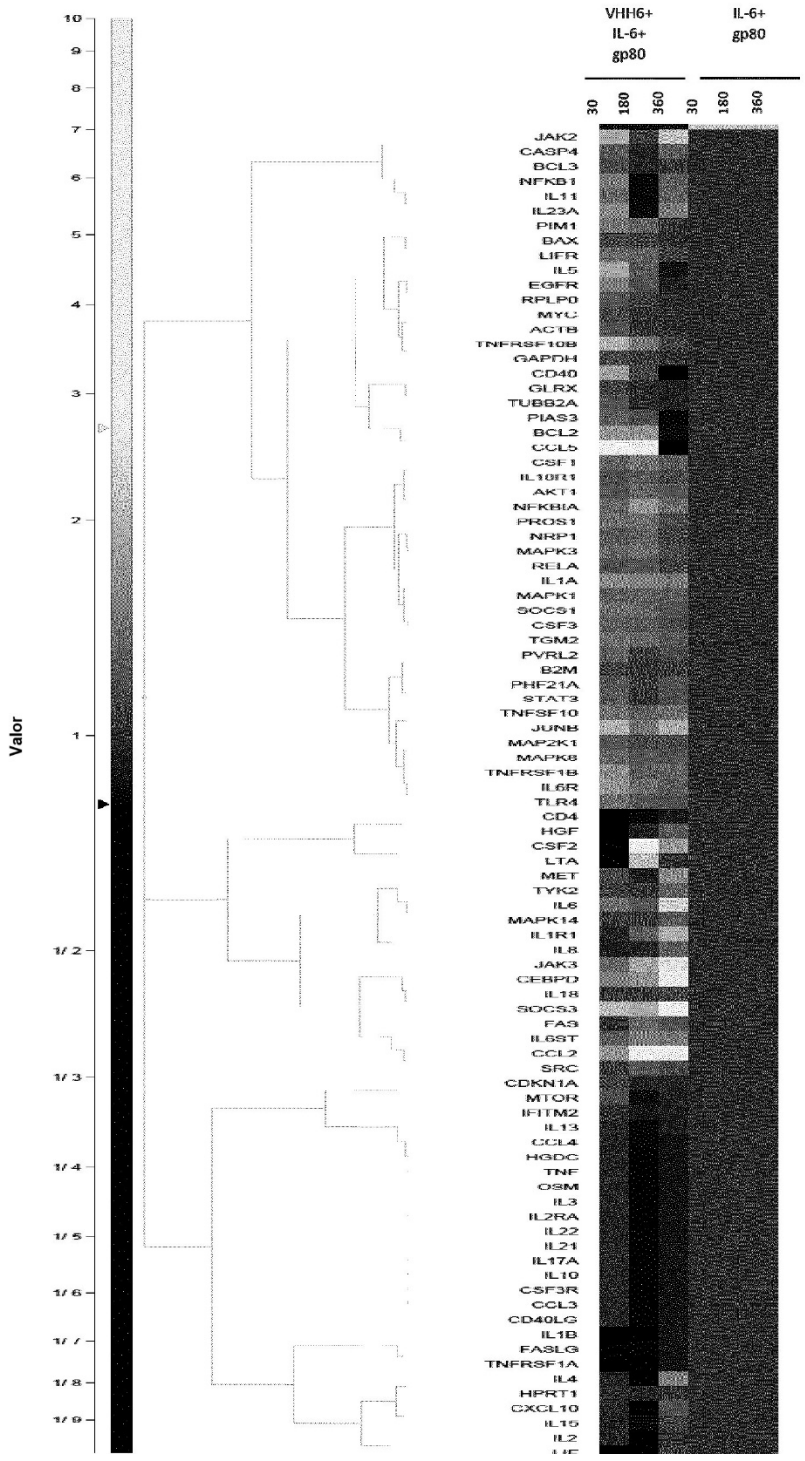

VHH6+
IL-6+
gp80
IL-6+
gp80
30
180
360
30
180
360
Valor
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
1/2
1/3
1/4
1/5
1/6
1/7
1/8
1/9
JAK2
CASP4
BCL3
NFKB1
IL11
IL23A
PIM1
BAX
LIFR
IL5
EGFR
RPLP0
MYC
ACTB
TNFRSF10B
GAPDH
CD40
GLRX
TUBB2A
PIAS3
BCL2
CCL5
CSF1
IL10R1
AKT1
NFKBIA
PROS1
NRP1
MAPK3
RELA
IL1A
MAPK1
SOCS1
CSF3
TGM2
PVRL2
B2M
PHF21A
STAT3
TNFSF10
JUNB
MAP2K1
MAPK8
TNFRSF1B
IL6R
TLR4
CD4
HGF
CSF2
LTA
MET
TYK2
IL6
MAPK14
IL1R1
IL8
JAK3
CEBPD
IL18
SOCS3
FAS
IL6ST
CCL2
SRC
CDKN1A
MTOR
IFITM2
IL13
CCL4
HGDC
TNF
OSM
IL3
IL2RA
IL22
IL21
IL17A
IL10
CSF3R
CCL3
CD40LG
IL1B
FASLG
TNFRSF1A
IL4
HPRT1
CXCL10
IL15
IL2

Figura 17

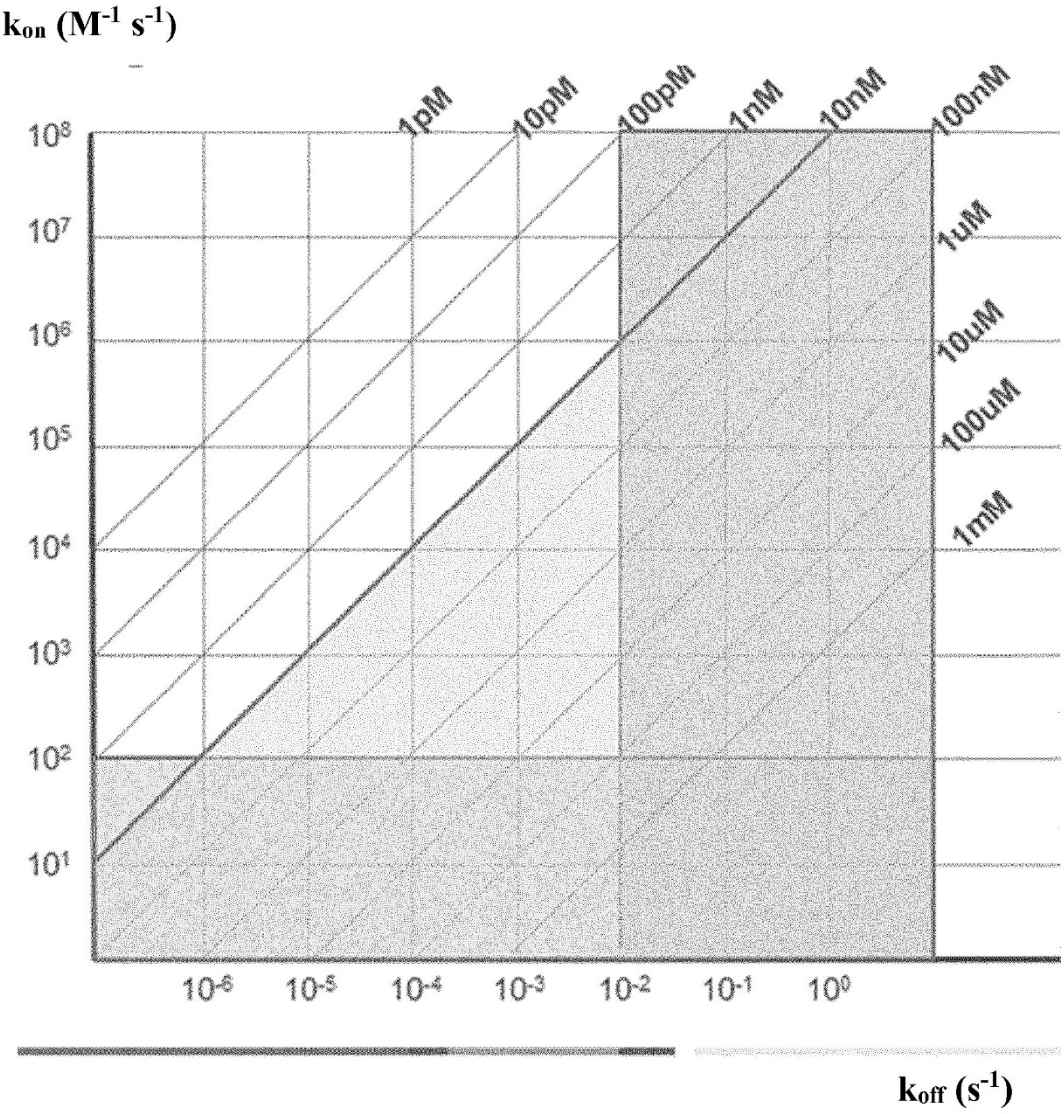

k_{on} (M^{-1} s^{-1})
1pM
10pM
100pM
1nM
10nM
100nM
1uM
10uM
100uM
1mM
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^{-6}
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^0
k_{off} (s^{-1})

Figura 18