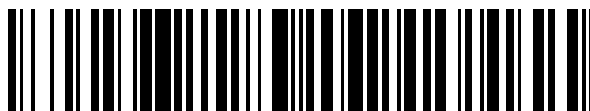


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 123**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2014** **PCT/EP2014/070692**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015** **WO15044386**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2014** **E 14777078 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3049439**

54 Título: **Nanobodies biespecíficos**

30 Prioridad:

26.09.2013 US 201361882877 P

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

13.08.2020

73 Titular/es:

ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

ROOBROUCK, ANNELIES;
STORTELERS, CATELIJNE;
VANLANDSCHOOT, PETER;
CONDE, MIGUEL;
STAELENS, STEPHANIE;
SOARES, HUGO y
SCHOLS, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 779 123 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanobodies biespecíficos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos biespecíficos tal como se define por las reivindicaciones que comprenden un dominio variable único de inmunoglobulina (ISV) primero, funcional, y uno segundo, de anclaje, en los que dicho primer ISV se une a una primera diana en la superficie de una célula cancerosa con una baja afinidad y, cuando se une, inhibe una función de dicha primera diana, y un dicho segundo ISV se une a una segunda diana en la superficie de dicha célula con una alta afinidad, y en los que dicha primera diana es diferente de dicha segunda diana. La presente divulgación divulga además métodos de identificación y elaboración de los mismos.

15 Antecedentes

Históricamente, un problema principal con las modalidades de tratamiento contra el cáncer era la falta de especificidad para la célula cancerosa. Una nueva era en terapia contra el cáncer comenzó con anticuerpos, que pueden conferir una verdadera terapia específica y dirigida. Ya en 1997, se aprobó el primer anticuerpo monoclonal, es decir, rituximab. Actualmente, los anticuerpos monoclonales se reconocen ampliamente como moléculas terapéuticas, con más de 23 aprobaciones solamente en los EE.UU., de las cuales ya 9 en el campo del cáncer. Desafortunadamente, ninguno de ellos es capaz de curar el cáncer como agentes individuales. No obstante, seis de los diez fármacos más vendidos en la actualidad son anticuerpos monoclonales. Este éxito inicial llevó a numerosas empresas a desarrollar también terapias basadas en anticuerpos monoclonales. Sin embargo, está disminuyendo la razón de terapias con anticuerpos monoclonales aprobadas en comparación con el número de anticuerpos monoclonales que ingresan a estudios clínicos.

Diversas células cancerosas sobreexpresan dianas, que están implicadas en el proceso maligno. HER2 y FGFR son ejemplos bien conocidos. No obstante, no todas las células malignas sobreexpresan dianas que contribuyen a la neoplasia maligna. Además, las células cancerosas rara vez tienen dianas únicas en su superficie. En cambio, las células cancerosas tienen generalmente una constitución de dianas diferente de las células normales. De hecho, muchas diferencias entre células normales y malignas son sólo diferencias de expresión. Este es también uno de los motivos por los que los biomarcadores de diagnóstico son tan difíciles de validar para el cáncer. No es sorprendente que los tratamientos contra el cáncer actuales afronten la dificultad de destruir células cancerosas pero evadiendo las células normales, considerando que los anticuerpos terapéuticos no sólo se unirán a su diana relacionada en la célula cancerosa sino que también en la célula normal, alterando la función de ambas. Esto da como resultado toxicidad y efectos secundarios no deseados. Los efectos secundarios más comúnmente observados de estos tratamientos incluyen náuseas, diarrea, estreñimiento, problemas con la coagulación sanguínea y cicatrización, tensión arterial alta, perforación gastrointestinal, mareos, anemia, enfisema, dolor y fatiga. Para los pacientes, tales efectos secundarios pueden tomar el control de la vida cotidiana. Pueden hacer que los pacientes se sientan incómodos en el mejor e indispuestos en el peor de los casos, lo que afecta a su capacidad para cumplir con sus tratamientos, o hacer que los tratamientos sean menos eficaces de lo que podrían ser. Estos efectos secundarios dan como resultado una carga alta tanto en el paciente así como en la sociedad. Varios ensayos clínicos tuvieron incluso que detenerse debido a la gravedad de los efectos secundarios y la toxicidad. Por ejemplo, los resultados iniciales con el anticuerpo 12F4 de GSK parecían muy prometedores. Sin embargo, los episodios cardiovasculares requirieron que se detuvieran los estudios clínicos. Otro ejemplo lo presenta el bloqueo de PDGFR β por CDP860, un conjugado fragmento Fab'-polietilenglicol diseñado por ingeniería genética, que condujo a una grave acumulación de líquidos en pacientes con cáncer de ovario o colorrectal, asociada con volumen vascularizado del tumor aumentado (Jayson *et al.* 2005, J Clin Oncol 23:973-981).

Un intento para disminuir la toxicidad y los efectos secundarios fue aumentado la afinidad de los anticuerpos para las dianas funcionales. Así, pudieron administrarse menores dosis de anticuerpos, que se unirían preferentemente a las células cancerosas que sobreexpresan estas dianas pero menos a células normales que tiene menos dianas. Aunque en teoría esto disminuiría la toxicidad y los efectos secundarios, un inconveniente principal de la afinidad aumentada fue la penetración tumoral reducida debido a la rápida eliminación del anticuerpo tras la internalización mediada por la diana (Schmidt *et al.* 2008 Canc Imm Imm 57(12): 1879-1890; Ackermann *et al.* 2008 Mol Cancer Ther 2008;7:2233-2240).

Un intento adicional para disminuir la toxicidad y los efectos secundarios no deseados fue creando anticuerpos biespecíficos que se unen a dos dianas diferentes (véase la revisión por Kontermann, MAbs 2012 4(2):182-97. doi: 10.4161/mabs.4.2.19000. Epub 1 de marzo de 2012: Dual targeting strategies with bispecific antibodies). Pueden usarse anticuerpos biespecíficos para el direccionamiento dual de receptores de la superficie celular esencialmente de dos maneras: (i) dirigiendo los receptores de la superficie celular expresados en la misma célula (actuando *in cis*), y (ii) redirigiendo un resto terapéuticamente activo, es decir, moléculas efectoras y células efectoras (actuando *in trans*). En su formato *cis* más simple, puede considerarse que una célula cancerosa comprende una combinación única de dos dianas en comparación con células normales. Esta combinación de dianas no está presente como tal

en células normales, pero cada diana individual está presente en un tipo de célula normal particular. Simplemente proporcionando una mezcla de dos anticuerpos monoclonales (AcM) que se unen cada uno a una diana específica no aumentaría la especificidad para la célula cancerosa. Por tanto, se planteó la hipótesis de que este inconveniente podría superarse creando anticuerpos biespecíficos capaces de la unión simultánea a dos dianas diferentes (véase, por ejemplo, Chames y Baty 2009 mAbs 1:6 539-549). Aunque se han generado con éxito anticuerpos biespecíficos, son difíciles de producir dado que requieren la fusión de una cadena pesada y una ligera, que en la práctica da como resultado una representación excesiva de productos de fusión erróneos. Por tanto, se han sugerido diversos formatos biespecíficos diferentes, la mayoría basados en la combinación de fragmentos monovalentes, pero ninguno de los cuales se ha aprobado. Se piensa que los fragmentos monovalentes carecen de la alta afinidad requerida y los largos tiempos de retención de anticuerpos convencionales. MEHD7945A es un ejemplo de un AcM “dos en uno” con especificidad para EGFR y Her3, que actualmente está sometiéndose a prueba en ensayos clínicos tempranos. Ambos miembros tienen altas afinidades para EGFR (1,9 nM) y Her3 (0,39 nM), pero no se demostró la unión simultánea a ambos receptores. En total, pocos candidatos basados en estos formatos han llegado a la práctica clínica. Basándose en esto, se sugirió desarrollar nuevos formatos.

Aparte del formato, se consideró deseable que cada uno de los dominios de unión individuales en el anticuerpo biespecífico debía unirse a una diana que contribuye a la neoplasia maligna, impidiendo de ese modo la posible abundancia o resistencia de dianas individuales. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico puede unirse a dos epítomos en el mismo receptor. Jaenichen *et al.* (2009) describen un Nanobody biespecífico, en el que los dominios se unen a diferentes epítomos en CXCR4. Además, se han generado biespecíficos con dos funcionalidades en células diferentes, por ejemplo, dirigiendo el sistema inmunitario del huésped hacia la célula cancerosa (formato *trans*). La aplicación más ampliamente usada de este enfoque es en inmunoterapia contra el cáncer, en la que los anticuerpos biespecíficos se han diseñado por ingeniería genética para unirse simultáneamente a una célula citotóxica (usando un CD3 similar a receptor) y una diana como célula tumoral que va a destruirse. Aunque este enfoque aumenta la eficacia de la terapia destruyendo células cancerosas, permanece el problema de la especificidad.

Los anticuerpos biespecíficos de la técnica se diseñan específicamente para unirse simultáneamente a múltiples rutas de activación del receptor y de transducción de la señalización aguas abajo.

Roovers *et al.* 2011 J Canc 129:2013-2024 se refieren a un Nanobody® anti-EGFR biparatópico que inhibe el crecimiento de tumores sólidos.

El documento WO2007/042289 en nombre de Ablynx se refiere a Nanobodies® y polipéptidos contra EGFR y/o IGF-IR, que son ambos antígenos asociados a tumor (AAT).

Rozan *et al.* 2013 Mol Canc Ther 12:1481-1491 se refieren a anticuerpos biespecíficos sin ligador y basados en anticuerpos de un solo dominio que seleccionan como diana y activan FcγRIIIa.

El documento WO2007/066106 en nombre de Domantis se refiere a ligandos que tienen especificidad de unión para EGFR y/o VEGF y que ambos funcionan para inhibir la función respectiva de su diana, pero no funcionan para potenciar la unión de su pareja.

El documento WO2013/064701 en nombre de ArgenX se refiere a anticuerpos biespecíficos y a métodos para aislar a los mismos, pero ambos no están presentes en la superficie de una célula.

El documento WO2010/037838 en nombre de Micromet se refiere a anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos específicos de especies cruzadas, de los cuales el 1^{er} resto se une a CD3ε, que funciona para reclutar la actividad de una célula efectora inmunitaria humana, mientras que el 2^o resto es un AAT.

El documento WO2009/030285 en nombre de Ablynx se refiere a moléculas de unión con múltiples sitios de unión, a composiciones que comprenden las mismas y a usos de las mismas, en las que el primer sitio de unión se superpone con el segundo sitio de unión.

Lu *et al.* 2004 JBC 279:2856-2865 se refieren al bloqueo simultáneo de ambas rutas de señalización de EGFR y de IGFIR en células cancerosas con un anticuerpo biespecífico recombinante completamente humano, en las que ambos restos de unión tienen una alta afinidad por su diana respectiva.

Robinson *et al.* 2008 Br J Canc 99:1415-1425 se refieren a la selección como diana del heterodímero de los AAT ErbB2 y ErbB3 con un Fv de cadena sencilla biparatópico (scFv).

El documento WO2012/042026 en nombre de Ablynx se refiere a materiales biológicos relacionados con c-Met, posiblemente en combinación con VEGF y/o EGFR, que son todos inhibidores y AAT.

Será evidente que sólo unas pocas patologías, por ejemplo, tipos de cáncer, son susceptible a este enfoque dado que no todas las células enfermas o aberrantes, por ejemplo, células malignas, sobreexpresan dianas que

contribuyen a la patología, por ejemplo, neoplasia maligna.

La unión a una diana de la superficie de una célula cancerosa a veces es insuficiente para administrar un efecto terapéutico potente. Recientemente, el concepto de conjugación de compuestos citotóxicos con anticuerpos monoclonales (denominados conjugados anticuerpo-fármaco o ADC) ha logrado un gran interés para mejorar la eficacia. Para la administración dirigida de una carga útil citotóxica, la elección de una diana que discrimina entre células tumorales y normales es incluso más crítica que para anticuerpos de bloqueo funcionales, debido a la alta toxicidad de las cargas útiles. Hasta donde se conoce, no existe ningún precedente para el uso de anticuerpos biespecíficos en ADC o radioinmunoterapia (RIT) para mejorar la selectividad tumoral.

Por consiguiente, existe margen de mejora.

Sumario de la invención

La terapia con anticuerpos es ahora una parte importante del arsenal terapéutico de los médicos para batallar con enfermedades y especialmente el cáncer. Todas las terapias con anticuerpos aprobadas contemporáneamente se basan en anticuerpos mono-específicos. Sin embargo, el uso médico de muchos de estos anticuerpos se ve gravemente impedido por su toxicidad sistémica intrínseca. El motivo principal que subyace a esta toxicidad generalizada es su patrón de unión pleotrópico: los anticuerpos se unen a sus dianas relacionadas no sólo en las células enfermas, tales como células cancerosas, sino también en células normales, dando como resultado toxicidad y efectos secundarios no deseados cuando se administran en altas dosis.

La técnica necesita terapias más eficaces, tales como terapias contra el cáncer, que tengan selectividad y especificidad superiores para células enfermas, tales como células cancerosas, con respecto a células normales, reduciendo de ese modo la toxicidad y los efectos secundarios.

Los presentes inventores propusieron la hipótesis de que la especificidad de la terapia con anticuerpos para la célula enferma, por ejemplo célula cancerosa, con respecto a la célula normal podría aumentarse significativamente por polipéptidos biespecíficos que comprendan al menos dos subunidades que tengan diferentes afinidades y funcionalidades. Este concepto no sólo aumenta la especificidad operacional para una célula enferma, disminuyendo de ese modo la toxicidad y los efectos secundarios, también amplía el número de posibles dianas terapéuticas. En la invención, estas subunidades o bloques de construcción son dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISV), tal como Nanobodies. El primer ISV de dicho polipéptido biespecífico se une a una primera diana en la superficie de una célula, pero debe tener, en contra de la intuición, una baja afinidad por su diana, lo que hace que este ISV sea esencialmente inactivo en ausencia de unión adicional a un marcador celular. Si se une a la diana, el primer ISV inhibe la función de la misma, tal como un receptor de la superficie celular implicado en el proceso maligno (ISV funcional). Sin embargo, dicho primer ISV sólo se unirá de manera eficaz a su diana, cuando esté soportado por el segundo ISV (ISV de anclaje). El segundo ISV de dicho polipéptido biespecífico se une con una alta afinidad a una segunda diana en la superficie de una célula, que es diferente de la primera diana (ISV de anclaje). Si se une a la diana, el ISV de anclaje inhibe preferiblemente la función del mismo hasta una cantidad limitada, si es que lo hace. Aunque la primera diana puede estar presente en células normales, la baja afinidad del ISV funcional, y por consiguiente la ausencia de unión, la función de células normales se verá mínimamente o no alterada. Preferiblemente, la función de las células normales también se altera marginalmente por la unión del ISV de anclaje, dado que este ISV de anclaje se desarrolla específicamente para minimizar su impacto sobre la función normal de la segunda diana. Sólo en el caso de células que expresan ambas dianas, el ISV de anclaje se une con alta afinidad y permite de ese modo que el ISV funcional perturbe de manera eficaz la función de la primera diana. Este concepto no sólo aumenta la especificidad para la célula enferma, por ejemplo, una célula cancerosa, disminuyendo de ese modo la toxicidad y los efectos secundarios, sino que también amplía el número de posibles dianas.

El concepto es ampliamente útil. Sin embargo, antes de que pudiera validarse este concepto, tenían que superarse diversos problemas prácticos por los presentes inventores.

(1) Tal como se estableció anteriormente, en general, los anticuerpos se seleccionan para determinar la afinidad más alta, mientras que los agentes de unión de baja afinidad se descartarán. En este caso, no sólo se requieren agentes de unión de baja afinidad, sino que estos agentes de unión de baja afinidad deben impedir al mismo tiempo la función de su diana cuando se unen. Dado que la unión no es sencilla, someter a prueba su función es un desafío.

(2) En el brazo de anclaje, debe comprobarse y someterse a prueba además que los agentes de unión de alta afinidad tengan sólo un impacto mínimo sobre la función de su diana.

(3) Debe establecerse que la interacción combinada de los dos bloques de construcción, por ejemplo ISV, en un formato biespecífico se lea correctamente, diferenciándose de un posible efecto aditivo de cada agente de unión individual.

Los presentes inventores superan estos problemas diseñando, entre otros, métodos de selección específicos tal

como resultará evidente más adelante en la solicitud.

Con el fin de validar la generalidad del concepto, los presentes inventores usaron la selección como diana selectiva de células madre leucémicas en LMA como caso de prueba, principalmente por tres motivos.

En primer lugar, la leucemia mielógena aguda (LMA) proporciona las dianas necesarias para demostrar la viabilidad del concepto como tal, dado que las dianas también se expresan de manera ubicua en células normales. En segundo lugar, es difícil que se unan específicamente a las dianas elegidas, dado que forman parte de grandes familias de receptores relacionados y, por tanto, difíciles de diferenciar entre sí. Así, si se demuestra la viabilidad del concepto con las dianas elegidas, puede suponerse con seguridad que el concepto funciona también con otras dianas. Además, existe una clara necesidad médica en LMA.

Tras demostrar la viabilidad del concepto en LMA, los inventores corroboraron además la amplia generalidad del concepto usando otros formatos, incluyendo combinaciones de dianas no relacionadas, para las que se desconoce la ubicación conjunta en la membrana celular. Se demostró selectividad tumoral potenciada con ISV de anclaje anti-CEA e ISV funcionales anti-EGFR. El concepto no sólo es aplicable en el campo del cáncer, sino también en todos los campos en los que la especificidad y selectividad de la célula diana frente a una célula normal es un problema (véase lo anterior). De hecho, los inventores demostraron un aumento de potencia de 150 veces en la inhibición de VIH usando ISV funcionales anti-CD4 e ISV de anclaje anti-CXCR4. Otra área en la que puede emplearse fácilmente el direccionamiento biespecífico es en el bloqueo preferencial o la interacción de subconjuntos de células normales. Como un ejemplo, ser capaz de modular específicamente las rutas inflamatoria e inmunitaria sólo en subconjuntos específicos de células T (es decir, aquellos relevantes para el proceso de enfermedad) podría proporcionar una mayor eficacia y menores toxicidades. También se demostró que subconjuntos de células T diferentes pero estrechamente relacionados implicados en inflamación pueden bloquearse específicamente mediante este enfoque, es decir, se usaron ISV contra los receptores de interleucina-12 (IL-12R) para células T_{H1} y el receptor 23 de interleucina-23 (IL-23R) para células T_{H17} como ISV funcionales y se usó un ISV anti-CD4 como ISV de anclaje.

Aumento de especificidad y selectividad en el direccionamiento de células tumorales ~ LMA

La leucemia es una enfermedad maligna de la médula ósea y la sangre que se caracteriza por la acumulación incontrolada de glóbulos blancos. La leucemia se clasifica como o bien mielógena o bien linfocítica, según el tipo de célula implicada (células precursoras mieloides o linfocitos T y B, respectivamente). La leucemia se clasifica además como o bien crónica o bien aguda, basándose en la presentación clínica y el transcurso. La leucemia aguda es una forma de la enfermedad que progresa rápidamente que da como resultado la acumulación de células funcionales inmaduras (blastocitos) en la sangre, la médula espinal y los tejidos. A menudo, la médula ya no puede producir suficientes glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, lo que conduce a anemia, capacidad reducida para combatir infecciones y hematomas y sangrado fáciles. La leucemia crónica progresa más lentamente y permite que se produzca un mayor número de células funcionales más maduras. El diagnóstico de leucemia requiere un análisis de sangre, una biopsia de médula ósea y, en algunos casos, una punción lumbar. Se usan histología, citometría de flujo (inmunofenotipado), citoquímica y citogenética (análisis de ADN) de la médula ósea y/o sangre para determinar el tipo y subtipo de leucemia exacto. Existen cuatro tipos principales de leucemia: (1) leucemia linfocítica aguda (LLA, también conocida como leucemia linfoide aguda o leucemia linfoblástica aguda); (2) leucemia mielógena crónica (LMC, también conocida como leucemia granulocítica crónica, leucemia mielocítica crónica o leucemia mielocítica crónica); (3) leucemia linfocítica crónica (LLC, también denominada leucemia linfoide crónica). La leucemia de células pilosas (LCP) es un tipo raro de leucemia linfoide crónica; y (4) leucemia mielógena aguda (LMA, también conocida como leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia granulocítica aguda o leucemia no linfocítica aguda). Los sellos distintivos de LMA son una proliferación anómala de células progenitoras mieloides ("blastocitos") en la médula ósea, tasa de autodestrucción reducida y detención de la diferenciación celular. Cuando los blastocitos pierden su capacidad para diferenciarse de manera normal y para responder a reguladores normales de la proliferación celular, el resultado son infecciones frecuentes, sangrado e infiltración de órganos. Las células leucémicas están dotadas de una ventaja de supervivencia anómala con respecto a células normales sanas, de manera que la médula ósea y la sangre periférica se pueblan cada vez más por blastocitos inmaduros que bordean a los glóbulos normales. La LMA es el trastorno mielocítico maligno más común en adultos. En los EE.UU., durante el año 2009: LMA: 12.810 nuevos casos (aproximadamente el 90% en adultos); LLA: 5.760; LMC: 5.050; LLC: ~15.490 nuevos casos; otras leucemias: 5.680. La mediana de edad de presentación es de 70 años, y la enfermedad afecta a más hombres que mujeres aunque la LMA infantil no es poco habitual. El tratamiento actual es quimioterapia agresiva. Existe una remisión completa en el 50-80% de los pacientes, pero con frecuencia enfermedad residual y recidiva. El trasplante de células madre autólogas o alogénicas se requiere para restaurar la inmunidad. La LMA se asocia con la tasa de supervivencia más baja de todas las leucemias. La tasa de supervivencia a los 5 años para pacientes menores de 60 años es del 30%, mientras que la tasa de supervivencia a los 5 años para pacientes mayores de 65 años es de menos del 10%. Así, existe una clara necesidad médica.

Se supone que la LMA se origina a partir de células madre leucémicas (LSC) inmaduras CD34+CD38- que residen en la médula ósea. Sólo los blastocitos o las LSC CD34+CD38- son capaces de injertar y establecer LMA en ratones NOD/SCID. Las LSC CD34+CD38- en la médula ósea puede evadir la muerte inducida por quimioterapia. Las

células estromales pueden proteger las células de LMA de la apoptosis inducida por quimioterapia. Por consiguiente, la terapia sólo es exitosa si puede eliminar células madre leucémicas de LMA en la médula ósea (MO).

Así, el direccionamiento selectivo y eficaz de LSC de LMA humanas requiere antígenos de la superficie celular que se expresen preferentemente en LSC de LMA en comparación con células madre hematopoyéticas normales, incluyendo CD123, CD44, CLL-1, CD96, CD47, CD32, CXCR4, Tim-3 y CD25. Los anticuerpos monoclonales (AcM) que seleccionan como diana CD44, CD123 y CD47 han demostrado eficacia contra LSC de LMA en modelos de xenotrasplante.

La existencia de LSC es un objeto de debate dentro de la investigación médica, porque muchos estudios no han descubierto con éxito las similitudes y diferencias entre células madre tisulares normales y células madre cancerosas. Se propone que las células madre tumorales persisten en tumores como población distinta y provocan recidiva y metástasis dando lugar a nuevos tumores. Por tanto, el desarrollo de terapias específicas dirigidas a CSC (células madre cancerosas) mantiene la esperanza de una mejora de la supervivencia y calidad de vida de pacientes con cáncer, especialmente para los que padecen enfermedad metastásica.

La primera evidencia concluyente para células madre cancerosas se publicó en 1997 en Nature Medicine. Bonnet y Dick aislaron una subpoblación de células leucémicas que expresan un marcador de superficie específico CD34⁺, pero carecen del marcador CD38. Los autores establecieron que la subpoblación de CD34⁺/CD38⁻ es capaz de iniciar tumores en ratones NOD/SCID que son histológicamente similares al donante. Evidencias adicionales provienen de la histología, el estudio de la estructura tisular de tumores. Muchos tumores son muy heterogéneos y contienen múltiples tipos de células nativas para el órgano huésped. La heterogeneidad se retiene comúnmente por metástasis tumorales. Esto implica que la célula que las produce tenía la capacidad de generar múltiples tipos de células. En otras palabras, posee un potencial multidiferenciativo, un sello distintivo clásico de células madre. Ya que las LSC formarían una proporción muy pequeña del tumor, esto puede no seleccionar necesariamente fármacos que actúen específicamente en las células madre. En la leucemia mieloide aguda humana, la frecuencia de estas células es de menos de 1 en 10.000. La teoría sugiere que las quimioterapias convencionales destruyen células diferenciadas o en diferenciación, que forman la mayor parte del tumor pero son incapaces de generar nuevas células. Una población de LSC, que la generó, podría permanecer intacta y provocar una recidiva de la enfermedad.

En el trabajo actual, se han usado los antígenos modelo CD123 y CXCR4. Aunque hasta donde se sabe, la expresión conjunta de CD123 y CXCR4 en LSC de LMA CD34⁺/CD38⁻ no se ha notificado, existen numerosos estudios que notifican la expresión de cualquiera de estos antígenos en LSC de LMA.

La expresión de CD123 se ha demostrado en blastocitos de LMA, así como en la subpoblación de CD34⁺/CD38⁻ en diferentes con pacientes LMA. A menudo se expresa junto con CD34 en otras leucemias, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B (LLA-B). Los blastocitos en el 91% de los pacientes con LLA-B expresaron ambos antígenos, mientras que el 11% no expresó ninguno. Por el contrario, se encontró que los precursores de células B normales de la médula ósea expresaban o bien CD123 o bien CD34, pero no la combinación (Hassanein *et al.* 2009, Am J Clin Pathol 2009 Oct;132(4):573-80: Distinct expression patterns of CD123 and CD34 on normal bone marrow B-cell precursors ("hematogones") and B lymphoblastic leukemia blasts).

De manera similar, se ha demostrado la expresión de CXCR4 en blastocitos de LMA así como en LSC de LMA CD34⁺/CD38⁻, pero también se expresa en células madre hematopoyéticas normales. Se ha encontrado que el inhibidor de CXCR4, plerixafor, es un fuerte inductor de la movilización de células madre hematopoyéticas desde la médula ósea hasta el torrente sanguíneo como células madre de sangre periférica. La movilización de células madre de sangre periférica, que es importante como fuente de células madre hematopoyéticas para el trasplante, se realiza generalmente usando G-CSF, pero no es eficaz en alrededor del 15 al 20% de pacientes. La combinación de G-CSF con plerixafor aumenta el porcentaje de personas que responden a la terapia y produce suficientes células madre para el trasplante. El fármaco está aprobado para pacientes con linfoma y mieloma múltiple, y se están llevando a cabo estudios clínicos de estadio temprano para el uso de plerixafor en LMA.

Un Nanobody biespecífico que inhiba CXCR4 sólo en el contexto de la combinación CXCR4/CD123 tendría el potencial para seleccionar como diana de manera selectiva LSC para su liberación de la médula ósea hacia la periferia en la que se vuelven accesibles para quimioterapia convencional en el caso de terapia posterior a la remisión en pacientes con LMA. Las células progenitoras y las células madre hematopoyéticas normales y los glóbulos blancos que no expresan CD123 (o sólo a niveles muy bajos) no se verían afectados.

El receptor acoplado a proteínas G (GPCR) CXCR4 y su factor 1 derivado del estroma de ligando (SDF-1/CXCL12) desempeñan papeles importantes debido a su implicación en la interferencia entre células de leucemia y el microentorno de la médula ósea (MO). La expresión de CXCR4 se asocia con un mal pronóstico en pacientes con LMA con y sin el gen FLT3 mutado. CXCL12, que se secreta de manera constrictiva de células estromales de la MO y células LMA, es crítico para la supervivencia y retención de células de LMA dentro de la MO. Se demostró *in vitro* que los antagonistas de CXCR4 inhibían la migración de células de LMA en respuesta a CXCL12. Además, se demostró que tales antagonistas inhiben la supervivencia y el potencial de formación de colonias de células de LMA

y anulan los efectos protectores de células estromales en apoptosis inducida por quimioterapia en células de LMA. Se encontró *in vivo*, usando modelos de ratones inmunodeficientes, que los antagonistas de CXCR4 inducían la movilización de células de LMA y células progenitoras hacia la circulación y potenciaban los efectos antileucémicos de la quimioterapia. A pesar de que los GPCR representan una de las principales dianas farmacéuticas, es sorprendente que la práctica clínica del tratamiento contra el cáncer incluya sólo unos pocos fármacos que actúan en la señalización mediada por GPCR. A pesar del reconocimiento de que los GPCR pueden actuar como oncogenes y supresores tumorales regulando las redes de señalización oncogénicas, se utilizan pocos fármacos que seleccionan como diana GPCR en terapia contra el cáncer. Entre los ejemplos esporádicos se encuentra el método de referencia de tratamiento endocrino para los cánceres de próstata y de mama sensibles a hormonas.

Por tanto, los presentes inventores diseñaron un anticuerpo biespecífico CXCR4-IL3Ra. Este anticuerpo biespecífico tiene el potencial para seleccionar como diana de manera selectiva LSC, dado que IL3Ra (también conocido como CD123) es un marcador para LSC. Las HSC y HPG normales y los glóbulos blancos normales no se verían afectados por el Nanobody CXCR4, ya que estas células sólo expresan débilmente o no expresan CD123.

En un estudio de prueba de concepto *in vitro* inicial de líneas celulares de LMA con diferentes niveles de expresión endógena de CXCR4 y CD123 se usaron para someter a prueba las potencias de polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD123. Los polipéptidos biespecíficos se sometieron a prueba para determinar las potencias en un ensayo quimiotáctico dependiente de CXCR4, en comparación con líneas celulares que expresan sólo CXCR4 o CXCR4 con el segundo receptor. Se midió un aumento de 15-150 sin precedentes en la potencia de los polipéptidos biespecíficos en comparación con el Nanobody CXCR4 monovalente, pero sólo en las células que expresan ambas dianas. Hubo un efecto claro de la posición del Nanobody CXCR4 en el polipéptido biespecífico, y sólo se observó el aumento de potencia selectiva para el Nanobody CXCR4 con la menor afinidad.

Aunque este concepto se sometió a prueba con dos Nanobodies CXCR4 distintos, con diferentes epítomos y afinidades, sólo mostraron un potenciamiento las combinaciones con un Nanobody CXCR4 de menor potencia (65 nM como monovalente). Esto indicaría que la afinidad es un parámetro crítico.

Además, el cambio a un anclaje completamente diferente usando un Nanobody CD4 de la misma afinidad (1 nM) dio como resultado un aumento de potencia de 150 veces. Dado que los niveles de expresión del anclaje CD4 fueron muchos mayores que para CD123 en las mismas células, parece que los niveles de expresión relativos del anclaje con respecto a la diana funcional pueden ser un determinante adicional para el nivel de potenciamiento logrado.

Aumento de especificidad y selectividad en el direccionamiento de células tumorales ~ EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro del receptor de tirosina cinasa ErbB que se expresa en muchas células humanas normales de origen epitelial, desempeñando un papel importante en el crecimiento, la diferenciación y la proliferación celular. En la piel, se expresa normalmente en la epidermis, las glándulas sebáceas y el epitelio del folículo piloso, en los que desempeña un número de papeles importantes en el mantenimiento de la salud de la piel normal. A menudo se sobreexpresa o desregula en una variedad de tumores sólidos, incluyendo neoplasias gastrointestinales. El EGFR desregulado puede dar como resultado crecimiento, proliferación y angiogénesis celular incontrolados, y se asocia con un peor pronóstico, manifestado por un potencial metastásico aumentado y una peor supervivencia global.

Se ha demostrado que EGFR está implicado en el crecimiento, la metástasis y la angiogénesis tumoral. Además, muchos cánceres expresan EGFR, tales como cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal y cáncer de vesícula biliar. Los agentes que seleccionan como diana la ruta de señalización mediada por EGFR forman parte cada vez más de las herramientas terapéuticas para el tratamiento de carcinoma avanzado de pulmón, de cabeza y cuello y colorrectal. Los inhibidores de EGFR aprobados en Europa incluyen los AcM panitumumab y cetuximab, y los inhibidores de tirosina cinasa erlotinib y gefitinib. Aunque se ha demostrado que estos fármacos son eficaces en el tratamiento de una variedad de neoplasias, toda la clase de agentes de EGFR se asocia con una alta prevalencia de efectos secundarios dermatológicos, más comúnmente erupción cutánea, y una alta tasa de interrupción del paciente debido a toxicidad. Este estado reversible requiere la intervención en aproximadamente un tercio de los pacientes. Se ha notificado erupción cutánea en el 80%-90% de los pacientes con cánceres colorrectales tratados con AcM dirigidos por EGFR. En el entorno clínico, hasta el 32% de médicos ha notificado la interrupción, y el 76% ha notificado el mantenimiento del tratamiento con EGFR debido a toxicidad de la piel (Melosky *et al.* 2009). Además de la toxicidad relacionada con la diana, debido a la alta expresión de EGFR en el hígado y otros tejidos normales, la dosis administrada es alta, ya que los anticuerpos saturan en primer lugar los tejidos normales. El direccionamiento de EGFR con agentes terapéuticos disponibles actualmente no es eficaz en todos los pacientes, o para todos los cánceres (por ejemplo, cánceres que expresan EGFR). Por tanto, existe la necesidad de agentes mejorados para tratar cáncer que expresa EGFR y otras patologías relacionadas con EGFR.

Como segunda diana de anclaje, se usó el antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CEACAM5).

CEA es un antígeno específico de tumor bien conocido expresado en muchos tipos de tumor. Es un marcador asociado a tumor establecido para cánceres del tracto gastrointestinal, encontrado también en cánceres de mama y de pulmón. CEA es una glicoproteína de la superficie celular anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que desempeña un papel en la adhesión celular. Una forma soluble aumenta en el suero en cáncer, y se usa como biomarcador (niveles de CEA normales en suero ≤ 5 ng/ml; niveles de CEA elevados > 5 ng/ml). La expresión de CEA se restringe a primates, y la expresión es baja en tejido normal, cuya expresión puede alcanzar niveles 60 veces mayores en un tumor que aquella en tejidos sanos. Sin embargo, CEA se elimina por fosfolipasas de la superficie celular a través de la escisión de su ligación a GPI, lo que provoca que la proteína se libere en la circulación, que actúa como sumidero.

La expresión conjunta de EGFR y CEA se ha notificado para los cánceres gástrico y colorrectal, en tumores primarios y en metástasis peritoneal, con una mayor expresión en membrana de CEA que EGFR en la mayoría de los casos (Ito *et al.* 2013, Tiernan *et al.* 2013). Esto convierte a CEA en una diana útil que sirve como anclaje para combinarse con EGFR para el bloqueo funcional de una manera selectiva de tumor.

Dado que el aumento de avidéz se basa en dos proteínas de membrana expresadas en la misma célula, no se espera que el CEA soluble actúe como sumidero para el Nanobody biespecífico de CEA.

También se ha demostrado en este caso los potenciamentos de potencia con polipéptidos biespecíficos para la combinación de dianas EGFR y CEACAM5, exclusivamente en células que expresan conjuntamente ambos receptores.

Aumento de especificidad y selectividad en el direccionamiento de subconjuntos de células T en inflamación

La inmunidad mediada por células T es un procedimiento adaptativo de desarrollo de linfocitos T específicos de antígeno (Ag) para eliminar infecciones virales, bacterianas o parasitarias, o células malignas. La inmunidad mediada por células T también puede implicar el reconocimiento aberrante de auto-Ag, lo que conduce a enfermedades inflamatorias autoinmunitarias. La inmunidad mediada por células T es el elemento central del sistema inmunitario adaptativo e incluye una respuesta primaria por células T indiferenciadas, funciones efectoras por células T activadas y persistencia de células T de memoria específica de Ag. La IL-12 está implicada en la diferenciación de células T indiferenciadas en células Th1. La IL-23 induce la diferenciación de células T CD4⁺ indiferenciadas en células T cooperadoras altamente patógenas.

Los receptores de IL-23 y IL-12 pertenecen a la misma familia de receptores de citocinas. Ambos receptores son heterodímeros, de los cuales se requieren ambas subunidades para la unión de alta afinidad del ligando y la actividad. El IL12R β 1 es el receptor común compartido por ambos heterodímeros, y se une tanto a IL-12 como a IL-23 a través de la subunidad 40 compartida. El IL12R β 2 se une específicamente a la subunidad p35 de IL-12, y por tanto es específico para el IL-12R. De manera similar, el IL-23R es la subunidad específica que se une a la subunidad p39 de IL-23. Las citocinas de IL-12 y IL-23, respectivamente, impulsan respuestas tipo Th1 y Th17. La expresión de cada uno de estos receptores se restringe a tipos de células específicos, tanto en ratón como en humano. Si bien IL12R β 2 se expresa por células NK y un subconjunto de células T, la expresión de IL-23R se restringe a subconjuntos de células T específicos, un número pequeño de células B y células linfoides innatas.

La IL-23 contribuye a la inflamación crónica induciendo la producción de IL-17 mediante células T de memoria. La inflamación mediada por células T_{H17} se ha identificado en varios órganos y tejidos humanos, incluyendo el ojo, el cerebro, la piel, el hígado, el colon, el riñón, los testículos, las articulaciones y el pulmón. Numerosas citocinas inducidas por células T_{H17} activadas, tales como IL-22, IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-6, desempeñan papeles esenciales durante las enfermedades inflamatorias. Estas citocinas conducen a la aparición de uveítis, encefalomiелitis autoinmunitaria, psoriasis, hepatitis, enfermedad inflamatoria intestinal, nefritis, orquitis, artritis reumática y asma.

Se ha demostrado que los polipéptidos biespecíficos CD4-IL-12R β 2 y CD4-IL-23R muestran bloqueo funcional selectivo de una manera específica del subconjunto de células T, en ensayos con células T heterogéneas así como PBMC. Además, se demostró la unión selectiva de los polipéptidos biespecíficos a subconjuntos de células T CD4⁺, mientras que los Nanobodies IL12R β 2 monovalentes sólo mostraron una mala unión a células T CD4⁺ y CD8⁺.

Con respecto a las afinidades, incluso Nanobodies de muy baja afinidad en el miembro funcional proporcionaron potenciamentos de potencia tras el formateado con un Nanobody CD4 de anclaje de alta afinidad. Aunque la unión celular podía no siempre medirse con precisión para Nanobodies con velocidades de disociación rápidas ($>1.E-02$), la competición por ligandos demostró bloqueo funcional con CI50 que oscilaban entre 10-16 nM.

Aumento de especificidad y selectividad en el direccionamiento de VIH ~ CXCR4 y CD4

La infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), si se deja sin tratar, casi siempre conduce a la muerte de la persona infectada. El VIH infecta las células T CD4⁺ y conduce a una disminución en el número de células T CD4⁺ en la persona infectada. Cuando los números de células T CD4⁺ disminuyen por debajo de un nivel

crítico, la inmunidad mediada por células se pierde de manera eficaz, y aparecen infecciones con una variedad de microbios oportunistas, dando como resultado el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Dado que la persona infectada por VIH ya no puede defenderse contra estas infecciones oportunistas, el paciente sucumbirá finalmente a una de estas infecciones.

Actualmente no hay disponible una cura para el VIH/SIDA. Sin embargo, las personas infectadas por VIH pueden suprimir la proliferación del virus por medio de una variedad de opciones de tratamiento antiviral. El tratamiento actual para la infección por VIH consiste en terapia antirretroviral altamente activa, o HAART (por sus siglas en inglés). La HAART consiste en la administración de un cóctel de múltiples compuestos antivirales. Sin embargo, dado que el VIH muta fácilmente, el virus a menudo se vuelve resistente a uno o más compuestos en el cóctel de la HAART. Además, la HAART se asocia con un número de efectos secundarios. Por tanto, se necesitan nuevas terapias para tratar la infección por VIH.

Un acontecimiento crítico durante la infección por VIH es la entrada de VIH en células T CD4⁺. Una vez que el virus ha entrado en las células T, el virus secuestra la maquinaria de replicación de la célula T para producir copias adicionales de VIH promoviendo de ese modo la infección. Impidiendo la entrada de VIH en las células T CD4⁺ proporciona una opción terapéutica importante para el tratamiento y la prevención de infección por VIH.

El VIH tiene la capacidad de mutar frecuentemente y se ha demostrado que es capaz de “mutar fuera”, y se vuelve resistente a, un número de regímenes de tratamiento antiviral, incluyendo regímenes que se dirigen hacia la inhibición de proteasas del VIH y transcriptasas inversas del VIH. De manera interesante, las opciones para que el VIH “mute alrededor” de terapias dirigidas a bloquear la entrada de células son más limitadas. Si un punto de entrada de células (por ejemplo, CXCR4) se bloquea por un agente (por ejemplo, un anticuerpo de bloqueo) previniendo de ese modo la unión del VIH, el virus no puede mutar fácilmente para encontrar otro punto de entrada. Además, el virus no puede mutar fácilmente para eliminar el agente (por ejemplo, el anticuerpo de bloqueo). Sin embargo, un desafío en terapias basadas en la prevención de que el VIH entre en las células es que los receptores usados por el VIH para la entrada de células tienen también una función “natural”. Administrar un agente de unión que prevenga la unión del VIH puede dar como resultado, por ejemplo, un receptor que se active de manera constitutiva o un receptor que no pueda activarse porque se impide que un ligando natural se una al receptor. El dominio variable único de inmunoglobulina y los constructos de polipéptido del mismo que se divulgan en el presente documento superan este desafío porque, mientras que inhiben la unión del VIH a CXCR4, no previenen la unión de un ligando natural a CXCR4 (ISV de anclaje). Aunque no se limita a un mecanismo específico, se supone que el dominio variable único de inmunoglobulina y los constructos de polipéptido del mismo tienen esta capacidad porque se unen selectivamente a CXCR4 en un sitio de unión de VIH, y no se unen en el sitio en el que se une el ligando natural.

El VIH entra en células T CD4⁺ mediante la unión de glicoproteínas, tales como gp120, en la superficie de la cápside de VIH a receptores en las células T CD4⁺ seguido por fusión de la envoltura viral con la membrana celular y la liberación de la cápside de VIH en la célula. El VIH se une a la célula CD4⁺ mediante la unión de gp120 a CD4 y un receptor de quimiocinas, o bien CXCR5 o bien CXCR4, en la superficie celular. Una vez que gp120 se une a la proteína CD4, el complejo de la envoltura experimenta un cambio estructural, exponiendo los dominios de unión a quimiocina de gp120 y permitiéndoles interactuar con el receptor de quimiocinas diana. Esta unión doble de gp120 a la célula T CD4⁺ acerca el virus y las membranas celulares, lo que permite la fusión de las membranas y la posterior entrada de la cápside viral en la célula. Por tanto, la prevención de la unión del VIH a gp120, CXCR4 o CXCR5 proporciona una estrategia poderosa para tratar la infección por VIH y prevenir la infección por VIH.

Los inventores demostraron que la unión simultánea tanto a CXCR4 como a CD4 de los polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4 da como resultado potencias fuertemente potenciadas en la neutralización de VIH1 que usa CXCR4.

Debido a su selectividad, el Nanobody biespecífico puede administrarse con seguridad a lo largo de un tiempo más prolongado, lo que conduce a un tratamiento mejorado.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.1: representación esquemática del sistema modelo.

Figura 1.2: unión de Nanobodies anti-IL-3Ra a IL-3Ra expresado en células.

Figura 1.3: unión de Nanobodies CXCR4 a diferentes líneas celulares que expresan CXCR4 (A, B), y desplazamiento de ligando para la unión a CXCR4 (panel C, D) (14E2 = 14E02).

Figura 1.4: unión de polipéptidos biespecíficos CXCR4-IL-3Ra a CXCR4-VLP y ectodominio de IL-3Ra recombinante.

Figura 1.5: niveles de expresión de antígeno de CXCR4 e IL-3Ra en las distintas líneas celulares tal como se

determina mediante FACS con anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 12G5 y anti-IL-3Ra 7G3, respectivamente.

Figura 1.6: unión de Nanobodies biespecíficos CXCR4-IL-3Ra a células con diferentes niveles de expresión relativos de los dos receptores. Se representan ejemplos representativos de polipéptidos biespecíficos de Nanobody CXCR4 281F12 y 14D09.

Figura 1.7: señales de MCF para la unión de los constructos de Nanobody® a 4,6 nM a las líneas celulares Jurkat E6-1 y MOLM-13. X indica bloque de construcción anti-CXCR4, I indica bloque de construcción anti-IL3Ra, X-I indica anti-CXCR4 en el extremo N-terminal y anti-IL3Ra en el extremo C-terminal, I-X indica la orientación inversa.

Figura 1.8: titulación de diferentes polipéptidos CXCR4-IL3Ra monovalentes y biespecíficos en un ensayo quimiotáctico inducido por CXCL-12 en las líneas celulares Jurkat E6-1 y MOLM-13. 14D09 y 281F12 son bloques de construcción anti-CXCR4; 55A01 y 57A07 son bloques de construcción anti-IL3Ra.

Figura 2.1: características de unión de Nanobodies CD4 monovalentes.

Figura 2.2: unión de los Nanobodies CD4-CXCR4 monovalentes y biespecíficos a CXCR4 en partículas lipídicas virales (CXCR4-lip) frente a partículas de control (null-lip) en ELISA.

Figura 2.3: análisis de unión de polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4 seleccionados a CXCR4 expresado en células expresados en células Jurkat E6.1, y a células THP-1 y MOLM-13 que expresan conjuntamente CXCR4 y CD4. Se usaron polipéptidos biespecíficos con el ligador 35GS. La detección se realizó a través de anticuerpos anti-etiqueta.

Figura 2.4: inhibición de quimiotaxia mediada por SDF-1 de polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4 a células Jurkat E6.1 y Molm-13. Se muestran los polipéptidos biespecíficos CXCR4#2-CD4#8 con los ligadores 35GS.

Figura 2.5: inhibición de la entrada de VIH1 mediante Nanobodies CXCR4-CD4 de las variantes de VIH1 resistentes a NL4.3 y AMD3100 de tipo natural en células MT-4.

Figura 3.1: los niveles de expresión de IL12Rβ1, IL23R y CD4 en células T activadas hacia el fenotipo T_{H1} se determinaron con anticuerpo IL-12Rβ1 de control, anticuerpo IL-23R policlinal, seguido por anti-PE de ratón secundario, anti-PE de cabra y anticuerpos de CD4 marcados con APC.

Figura 3.2: unión de IL23R (panel A), IL12Rβ1 (panel B) y Nanobodies CD4 (panel C) a células T diferenciadas hacia el fenotipo T_{H17} mediante citometría de flujo. Las células T activadas se diferenciaron dentro de una mezcla de PBMC hacia células Th17 en presencia de cóctel de citocinas e IL-23 recombinante.

Figura 3.4: vista general del panel de polipéptidos biespecíficos CD4-IL12Rβ2, CD4-IL12Rβ1 y CD4-IL23R.

Figura 3.5: curvas de respuesta a la dosis de los Nanobodies IL12R e IL23R biespecíficos y monovalentes en células MOLM-13 en FACS. Niveles de expresión de CD4 en células MOLM-13. (US, sin teñir, a-CD4, detección usando anti-CD4 humano APC.

Figura 3.6: curvas de respuesta a la dosis de los polipéptidos biespecíficos CD4-IL12Rβ2, CD4-IL12Rβ1 y CD4-IL23R en comparación con sus Nanobodies monovalentes respectivos en células T activadas en FACS.

Figura 3.7: análisis de unión de Nanobodies y polipéptidos biespecíficos monovalentes a células T CD8⁺ aisladas. Se usa Nanobody Cablys3 como control irrelevante. La detección se realizó a través de detección anti-Flag. El recuadro muestra los niveles de expresión de marcadores de células T con anticuerpos de control para CD3 y CD8, respectivamente, tras el aislamiento de células positivas para CD8 de capas leucocitarias humanas.

Figura 3.8: unión de Nanobodies a células activadas T_{H1} regulada para CD8⁺ (gris oscuro) o CD4⁺ (gris claro) en un experimento de FACS multicolor. La unión de Nanobodies se determinó usando detección de anti-flag-APC.

Figura 3.9: bloqueo de la función de producción de citocinas inducida por IL-12 en células T humanas por polipéptidos biespecíficos y Nanobodies monovalentes. Panel A - C; titulación de IL-12. Panel D.

Figura 3.10: inhibición de la secreción de IFN-γ dependiente de IL-12 por Nanobodies y polipéptidos biespecíficos monovalentes en PBMC humanas. Se muestran gráficos representativos obtenidos con células T de un donante.

Figura 3.11: inhibición de la secreción de IL-17 dependiente de IL-23 por Nanobodies y polipéptidos biespecíficos monovalentes en PBMC humanas.

Figura 4.1: análisis de unión de Nanobodies monovalentes a células HER-14 que expresan sólo EGFR, y células

LoVo que expresan tanto EGFR como CEACAM5 determinado mediante citometría de flujo a través de detección de etiquetas anti-Flag. La expresión de EGFR y CEACAM5 en células Lovo, HT-29, HeLa y Her14 se detectó mediante anti-EGF humano policlonal R-PE y el anticuerpo anti-CEACAM5/CD66e humano (PE), respectivamente.

5 Figura 4.2: vista general de Nanobodies monoespecíficos y polipéptidos biespecíficos EGFR-CEA generados.

Figura 4.3: efecto de formatear en polipéptidos biespecíficos EGFR-CEA sobre la unión a dianas mediante ELISA en CEACAM5 o EGFR recombinante, respectivamente. La unión se detectó a través de anticuerpos secundarios anti-flag-HRP.

10 Figura 4.4: análisis de unión de los Nanobodies monoespecíficos y polipéptidos biespecíficos en células EGFR+/CEA-HER-14 y células EGFR+/CEA+ LoVo mediante citometría de flujo.

15 Figura 4.5: inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de EGFR tirosina mediada por EGF mediante polipéptidos biespecíficos y Nanobodies monoespecíficos en células EGFR+/CEA+ LoVo y células EGFR+/CEA-Her14. Los datos indican valores promedio de duplicados + desv.est.

Descripción de la invención

20 Las secuencias de inmunoglobulina, tales como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de los mismos (por ejemplo, dominios variables únicos de inmunoglobulina o ISV), se usan para seleccionar como diana específicamente sus antígenos respectivos en investigación y aplicaciones terapéuticas. La generación de dominios variables únicos de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, VHH o Nanobodies puede implicar la inmunización de un animal experimental tal como una llama, la construcción de bibliotecas de fagos a partir de tejido inmunitario, la
25 selección de dominios variables únicos de inmunoglobulina de unión a antígeno de visualización de fagos y la detección de dichos dominios y constructos diseñados por ingeniería genética de los mismos para las especificidades deseadas (documento WO 94/04678). Alternativamente, pueden generarse dominios variables únicos de inmunoglobulina similares tales como, por ejemplo, dAc mediante la selección de dominios variables
30 únicos de inmunoglobulina de unión a antígeno de visualización de fagos directamente de bibliotecas simples o sintéticas y la detección posterior de dichos dominios y constructos diseñados por ingeniería genética de los mismos para las especificidades deseadas (Ward *et al.*, Nature, 1989, 341: 544-6; Holt *et al.*, Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; así como, por ejemplo, el documento WO 06/030220, el documento WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd.). Desafortunadamente, el uso de anticuerpos monoclonales y/o muy diseñados por ingeniería genética también conlleva un alto coste de fabricación y puede dar como resultado
35 penetración tumoral subóptima en comparación con otras estrategias.

El "polipéptido de la invención" tal como se usa en el presente documento es tal como se define por las reivindicaciones. Específicamente, la invención proporciona:

40 Un polipéptido que comprende unos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISV) primero y segundo, en el que

- dicho primer ISV se une a una primera diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 200 nM tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial;

45 - dicho segundo ISV se une a una segunda diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 0,1 pM tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; y

50 en el que dicho primer ISV y dicho segundo ISV se unen a dicha primera diana y dicha segunda diana presentes en la superficie de la misma célula,

en el que dicha primera diana es diferente de dicha segunda diana,

en el que dicho segundo ISV potencia la unión de dicho primer ISV,

55 en el que la unión por dicho primer ISV inhibe una función de dicha primera diana,

60 en el que dicha primera diana se elige del grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras (preferiblemente clase I), GPCR, DDR1, discoidina I (antígeno CD167a), DDR2, ErbB-1, C-erbB-2, FGFR-1, FGFR-3, antígeno CD135, antígeno CD 117, proteína tirosina cinasa-1, c-Met, antígeno CD148, C-ret, ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, antígeno CD202b, Trk-A, Trk-B, Trk-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, receptor Notch 1-4, receptor FAS, DR5, DR4, CD47, CX3CR1, CXCR-3, CXCR-4, CXCR-7, proteína 2 de unión a quimiocina, y CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11; y

65 dicha segunda diana se elige del grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario ("CEA"), MART-1, gp100,

MAGE-1, HER-2, y antígenos de Lewis^y, CD123, CD44, CLL-1, CD96, CD47, CD32, CXCR4, Tim-3, CD25, TAG-72, Ep-CAM, PSMA, PSA, GD2, GD3, CD4, CD5, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD45, CD52 y CD147; y receptores de citocinas incluyendo cadena gamma del receptor de interleucina-2 (antígeno CD132); cadena alfa del receptor de interleucina-10 (IL-10R-A); cadena beta del receptor de interleucina-10 (IL-10R-B); cadena beta-1 del receptor de interleucina-12 (IL-12R-beta1); cadena beta-2 del receptor de interleucina-12 (beta-2 del receptor de IL-12); cadena alfa-1 del receptor de interleucina-13 (IL-13R-alfa-1) (antígeno CD213 al); cadena alfa-2 del receptor de interleucina-13 (proteína de unión a interleucina-13); receptor de interleucina-17 (receptor de IL-17); receptor de interleucina-17B (receptor de IL-17B); precursor del receptor de interleucina-21 (IL-21R); receptor de interleucina-1, tipo I (IL-1R-1) (CD121a); receptor de interleucina-1, tipo II (IL-1R-beta) (CDw121b); proteína antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra); cadena alfa del receptor de interleucina-2 (antígeno CD25); cadena beta del receptor de interleucina-2 (antígeno CD122); cadena alfa del receptor de interleucina-3 (IL-3R-alfa) (antígeno CD123).

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención.

La invención proporciona además el polipéptido de la invención para su uso en un método para administrar un polipéptido profiláctico o terapéutico, un conjugado polipéptido-fármaco (PDC) o agente de obtención de imágenes a una ubicación, un tejido o un tipo de célula específicos en el cuerpo, comprendiendo el método las etapas de administrar a un sujeto un polipéptido de la invención;

o para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesita.

Definiciones:

a) A menos que se indique o defina lo contrario, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que será evidente para el experto en la técnica. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales mencionados en el párrafo a) en la página 46 del documento WO 08/020079.

b) A menos que se indique lo contrario, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" o "ISV" se usa como un término general para incluir, pero no se limita a, dominios de unión a antígeno o fragmentos tales como dominios V_{HH} o dominios V_H o V_L, respectivamente. Los términos moléculas de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno se usan de manera intercambiable y también incluyen el término Nanobodies. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia de V_L), o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia de V_H); más específicamente, pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cadena pesada. Por consiguiente, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser anticuerpos de dominio, o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpos de un solo dominio, "dAc", o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como dAc, o Nanobodies incluyendo, pero sin limitarse a, secuencias de V_{HH}. La invención incluye secuencias de inmunoglobulina de diferente origen, que comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, mono, humano y camélido. El dominio variable único de inmunoglobulina incluye secuencias de inmunoglobulina completamente humanas, humanizadas, secuencias optimizadas de otra manera o quiméricas. Sin embargo, puede considerarse que el dominio variable único de inmunoglobulina y la estructura de un dominio variable único de inmunoglobulina, sin limitarse a lo mismo, estén compuestos por cuatro regiones de entramado o "FR", que se denominan en la técnica y en el presente documento "región de entramado 1" o "FR1"; "región de entramado 2" o "FR2"; "región de entramado 3" o "FR3"; y "región de entramado 4" o "FR4", respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de la complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de la complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de la complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Cabe destacar que los términos Nanobody o Nanobodies son marcas registradas de Ablynx N.V. y, por tanto, también pueden denominarse Nanobody® o Nanobodies®, respectivamente.

c) A menos que se indique lo contrario, los términos "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia", "secuencia de nucleótidos" y "ácido nucleico" son tal como se describen en el párrafo b) en la página 46 del documento WO 08/020079.

d) A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, las etapas, las técnicas y las manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se*, tal como resultará evidente para el experto en la técnica. Por tanto, se hace referencia de nuevo a los manuales convencionales y los antecedentes generales de la técnica mencionados en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en el presente documento; así como a, por ejemplo, las siguientes revisiones: Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin y Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving *et al.*, J. Immunol. Methods, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz *et al.*, Placenta, 2000, 21 suppl. A, S106-12, Gonzales *et al.*, Tumour Biol.,

2005, 26(1), 31-43, que describe técnicas para el diseño por ingeniería genética de proteínas, tales como maduración por afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.

e) Los residuos de aminoácido se indicarán según el código de aminoácidos convencional de tres letras o de una letra. Se hace referencia a la tabla A-2 en la página 48 de la solicitud internacional WO 08/020079 de Ablynx N.V. titulada *"Immunoglobulin single variable domains targeted against IL-6R and polypeptides comprising the same for the treatment of diseases and disorders associated with IL-6 mediated signalling"*.

f) Con fines de comparación de dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos puede calcularse o determinarse tal como se describe en el párrafo e) en la página 49 del documento WO 08/020079, tal como dividiendo *[el número de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos]* entre *[el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos]* y multiplicando por *[100%]*, en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos, en comparación con la primera secuencia de nucleótidos, se considera una diferencia en un nucleótido individual (posición); o usando un algoritmo o una técnica computacional adecuada, de nuevo tal como se describe en el párrafo e) en las página 49 del documento WO 08/020079.

g) Con fines de comparación de dos o más dominios variables únicos de inmunoglobulina u otras secuencias de aminoácidos tales como, por ejemplo, los polipéptidos de la invención, etc., el porcentaje de "identidad de secuencia" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos (también denominado en el presente documento "identidad de aminoácidos") puede calcularse o determinarse tal como se describe en el párrafo f) en las páginas 49 y 50 del documento WO 08/020079, tal como dividiendo *[el número de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos]* entre *[el número total de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácidos]* y multiplicando por *[100%]*, en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la primera secuencia de aminoácidos, se considera una diferencia en un residuo de aminoácido individual (posición), es decir, una "diferencia de aminoácido" tal como se define en el presente documento; o usando un algoritmo o una técnica computacional adecuada, de nuevo tal como se describe en el párrafo f) en las páginas 49 y 50 del documento WO 08/020079.

Además, en la determinación del grado de identidad de secuencia entre dos dominios variables únicos de inmunoglobulina, el experto en la técnica puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácido "conservadoras", tal como se describe en la página 50 del documento WO 08/020079.

Cualquier sustitución de aminoácido aplicada a los polipéptidos descritos en el presente documento también puede basarse en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrollado por Schulz *et al.*, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de posibles formadores de estructuras desarrollado por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, y en el análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollado por Eisenberg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte y Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 1981, y Goldman *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986. Se proporciona información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de Nanobodies en la descripción en el presente documento y en los antecedentes generales de la técnica citados anteriormente. Además, con este fin, la estructura cristalina de un dominio V_{HH} de una llama se proporciona, por ejemplo, por Desmyter *et al.*, Nature Structural Biology, vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli *et al.*, Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; y Decanniere *et al.*, Structure, vol. 7, 4, 361 (1999). Puede encontrarse información adicional sobre algunos de los residuos de aminoácido que en dominios V_H convencionales forman la superficie de contacto V_H/V_L y posibles sustituciones camelizantes en estas posiciones en la técnica anterior citada anteriormente.

h) Se dice que dominios variables únicos de inmunoglobulina y secuencias de ácido nucleico son "exactamente los mismos" si tienen una identidad de secuencia del 100% (tal como se define en el presente documento) con respecto a toda su longitud.

i) Cuando se comparan dos dominios variables únicos de inmunoglobulina, el término "diferencia de aminoácido" se refiere a una inserción, delección o sustitución de un residuo de aminoácido individual en una posición de la primera secuencia, en comparación con la segunda secuencia; entendiéndose que dos dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden contener una, dos o más de tales diferencias de aminoácido.

j) Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos "comprende" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o "consiste esencialmente en" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, esto tiene el significado proporcionado en el párrafo i) en las páginas 51-52 del documento WO 08/020079.

k) El término “en forma esencialmente aislada” tiene el significado que se le proporciona en el párrafo j) en las páginas 52 y 53 del documento WO 08/020079.

5 l) Los términos “dominio” y “dominio de unión” tienen los significados que se les proporciona en el párrafo k) en la página 53 del documento WO 08/020079.

10 m) Los términos “determinante antigénico” y “epítipo”, que también pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento, tienen los significados que se les proporciona en el párrafo l) en la página 53 del documento WO 08/020079.

15 n) Tal como se describe adicionalmente en el párrafo m) en la página 53 del documento WO 08/020079, se dice que una secuencia de aminoácidos (tal como un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o generalmente una proteína o un polipéptido de unión antígeno o un fragmento de los mismos) que puede unirse (específicamente) a, que tiene afinidad para y/o que tiene especificidad para un determinante antigénico, un epítipo, un antígeno o una proteína específicos (o para al menos una parte, un fragmento o un epítipo de los mismos), es “contra” o “se dirige contra” dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

20 o) El término “especificidad” se refiere al número de tipos de antígenos o determinantes antigénicos diferentes a los que puede unirse una molécula de unión a antígeno particular o una molécula de proteína de unión a antígeno (tal como un ISV, Nanobody o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en la afinidad y/o avidez.

25 La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (K_D o KD), es una medición para la fuerza de unión entre un determinante antigénico, es decir, la diana, y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno, es decir, el ISV o Nanobody: cuanto menor sea el valor de la K_D , más fuerte será la fuerza de unión entre un determinante antigénico y la molécula de unión a antígeno (alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (K_A), que es $1/K_D$). Tal como resultará evidente para el experto en la técnica (por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en el presente documento), la afinidad puede determinarse de una manera conocida *per se*, dependiendo del antígeno específico de interés.

35 La avidez es la afinidad del polipéptido, es decir el ligando es capaz de unirse a través de dos (o más) farmacóforos (ISV) en los que las múltiples interacciones se sinergizan para potenciar la afinidad “aparente”. La avidez es la medición de la fuerza de unión entre el polipéptido de la invención y los antígenos pertinentes. El polipéptido de la invención es capaz de unirse a través de sus dos (o más) ISV, tales como Nanobodies, a las al menos dos dianas, en el que las múltiples interacciones, por ejemplo el primer ISV, tal como Nanobody, que se une a la primera diana y el segundo ISV, tal como Nanobody, que se une a la segunda diana, se sinergizan para potenciar la afinidad “aparente”. La avidez se refiere tanto a la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno como al número de sitios de unión pertinentes presentes en las moléculas de unión a antígeno. Por ejemplo, y sin limitación, los polipéptidos que contienen dos o más bloques de construcción, tales como ISV o Nanobodies dirigidos contra dianas en una célula y en particular contra CXCR4 humana y CD123 humana pueden (y normalmente podrán) unirse con una mayor avidez que cada uno de los monómeros individuales o bloques de construcción individuales, tales como, por ejemplo, los ISV o Nanobodies monovalentes, comprendidos en los polipéptidos de la invención.

50 En la presente invención, se dice que las proteínas de unión a antígeno monovalentes (tales como bloques de construcción, ISV, secuencias de aminoácido, Nanobodies y/o polipéptidos de la invención) se unen a su antígeno con una alta afinidad cuando la constante de disociación (K_D) es de 10^{-9} a 10^{-12} moles/litro o menos, y preferiblemente de 10^{-10} a 10^{-12} moles/litro o menos y más preferiblemente de 10^{-11} a 10^{-12} moles/litro (es decir con una constante de asociación (K_A) de 10^9 a 10^{12} litro/moles o más, y preferiblemente de 10^{10} a 10^{12} litro/moles o más y más preferiblemente de 10^{11} a 10^{12} litro/moles).

55 En la presente invención, se dice que proteínas monovalentes de unión a antígeno (tales como los bloques de construcción, ISV, secuencias de aminoácidos, Nanobodies y/o polipéptidos de la invención) se unen a su antígeno con una baja afinidad cuando la constante de disociación (K_D) es de 10^{-6} a 10^{-9} moles/litro o más, y preferiblemente de 10^{-6} a 10^{-8} moles/litro o más, y más preferiblemente de 10^{-6} a 10^{-7} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^6 a 10^9 litro/moles o más, y preferiblemente de 10^6 a 10^8 litro/moles o más, y más preferiblemente de 10^6 a 10^7 litro/moles).

60 Una afinidad media puede definirse como valores que oscilan entre alta-baja, por ejemplo de 10^{-8} a 10^{-10} moles/litro.

65 En general, se considera que cualquier valor de K_D mayor de 10^{-4} mol/litro (o valor de K_A menor de 10^4 M⁻¹) litros/mol indica unión no específica.

Los polipéptidos de la invención comprenden un primer y un segundo bloque de construcción, que son un primer y un segundo ISV, tal como un primer y un segundo Nanobody. Preferiblemente, la afinidad de cada ISV, tal como Nanobody, se determina individualmente. En otras palabras, la afinidad se determina para el ISV monovalente, tal como Nanobody, independientemente de los efectos de avidéz debidos al otro ISV, tal como Nanobody, que puede o no estar presente. La afinidad para un ISV monovalente, tal como Nanobody, puede determinarse en el ISV monovalente, tal como Nanobody, *per se*, es decir cuando dicho ISV monovalente, tal como Nanobody, no está comprendido en el polipéptido de la invención. De manera alternativa o adicional, la afinidad para un ISV monovalente, tal como Nanobody, puede determinarse en una diana mientras la otra diana está ausente.

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

La constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente, tal como resultará evidente para el experto en la técnica. Los métodos para determinar la constante de disociación serán evidentes para el experto en la técnica, y por ejemplo incluyen las técnicas mencionadas en el presente documento. A este respecto, también resultará evidente que puede no ser posible medir constantes de disociación de más de 10^{-4} moles/litro o 10^{-3} moles/litro (por ejemplo, de 10^{-2} moles/litro). Opcionalmente, tal como también resultará evidente para el experto en la técnica, la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse basándose en la constante de asociación (K_A) (real o aparente), por medio de la relación [$K_D = 1/K_A$].

La afinidad indica la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se proporciona comúnmente mediante la K_D , o constante de disociación, que tiene las unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como una constante de asociación, K_A , que es igual a $1/K_D$ y tiene las unidades de (mol/litro) $^{-1}$ (o M $^{-1}$). En la presente memoria descriptiva, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas (tales como una secuencia de aminoácidos, un Nanobody o un polipéptido de la invención y su diana prevista) se expresará principalmente en cuanto al valor de K_D de su interacción; para el experto en la técnica resulta evidente que en vista de la relación $K_A = 1/K_D$, que especifica la fuerza de interacción molecular por su valor de K_D , también puede usarse para calcular el valor de K_A correspondiente. El valor de K_D también caracteriza la fuerza de una interacción molecular en un sentido termodinámico ya que se refiere a la energía libre (DG) de unión mediante la relación bien conocida $DG = RT \cdot \ln(K_D)$ (de manera equivalente $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$), en la que R es igual a la constante de los gases, T es igual a la temperatura absoluta y ln indica el logaritmo neperiano.

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

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

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse a través de diferentes técnicas conocidas *per se*, tales como la técnica de biosensor bien conocida de resonancia de plasmón superficial (SPR) (véase, por ejemplo, Ober *et al.*, Intern. Immunology, 13, 1551-1559, 2001). El término "resonancia de plasmón superficial", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor, en la que una molécula se inmoviliza en el chip biosensor y la otra molécula se hace pasar sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo proporcionando mediciones de k_{on} , k_{off} y, por tanto, valores de K_D (o K_A). Esto puede realizarse, por ejemplo, usando el sistema BIAcore(R) bien conocido (BIAcore International AB, una empresa de GE Healthcare, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jonsson, U., *et al.* (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U., *et al.* (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) J Mol. Recognit. 8: 125-131; y Johnsson, B., *et al.* (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

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

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

Sin embargo, la medición precisa de K_D puede ser bastante laboriosa, y como consecuencia, a menudo se determinan valores de K_D aparente para evaluar la fuerza de unión de dos moléculas. Cabe destacar que siempre que se realicen todas las mediciones de una manera uniforme (por ejemplo, manteniendo las condiciones de ensayo sin cambiar), pueden usarse las mediciones de K_D aparente como aproximación de la K_D real y, por tanto, en el presente documento K_D y K_D aparente deben tratarse con igual importancia o relevancia.

Finalmente, cabe destacar que en muchas situaciones el científico experimentado puede juzgar que es conveniente determinar la afinidad de unión con respecto a alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la fuerza de unión entre las moléculas A y B, puede usarse, por ejemplo, una molécula C de referencia que se sabe que se une a B y que está etiquetada de manera adecuada con un grupo fluoróforo o cromóforo u otro resto químico, tal como biotina para una detección fácil en un ELISA o FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) u otro formato (el fluoróforo para la detección por fluorescencia, el cromóforo para la detección por absorción de luz, la biotina para la detección por ELISA mediada por estreptavidina). Normalmente, la molécula C de referencia se mantiene a una concentración fija y la concentración de A se varía para una concentración o cantidad de B dada. Como resultado, se obtiene un valor de CI_{50} correspondiente a la concentración de A a la que se reduce a la mitad la señal medida para C en ausencia de A. Siempre que se conozca $K_{D \text{ ref}}$, la K_D de la molécula de referencia, así como la concentración c_{ref} total de la molécula de referencia, la K_D aparente para la interacción A-B puede obtenerse a partir de la siguiente fórmula: $K_D = CI_{50} / (1 + c_{\text{ref}} / K_{D \text{ ref}})$. Obsérvese que si $c_{\text{ref}} \ll K_{D \text{ ref}}$, $K_D \approx CI_{50}$. Siempre que se realice la medición de la CI_{50} de una manera uniforme (por ejemplo, manteniendo c_{ref} fija) para los grupos de unión que se comparan, la fuerza o estabilidad de una interacción molecular puede evaluarse mediante la CI_{50} y esta medición se juzga como equivalente a K_D o a K_D aparente a lo largo de todo este texto.

p) La semivida de una secuencia de aminoácidos, un compuesto o polipéptido de la invención puede definirse generalmente tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 y tal como se menciona en el mismo se refiere al tiempo necesario para que la concentración en suero de la secuencia de aminoácidos, el compuesto o polipéptido se reduzca en un 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación de la secuencia o el compuesto y/o aclaramiento o secuestro de la secuencia o el compuesto mediante mecanismos naturales. La semivida *in vivo* de una secuencia de aminoácidos, un compuesto o polipéptido de la invención puede determinarse de cualquier manera conocida *per se*, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas resultarán evidentes para el experto en la técnica, y pueden ser generalmente, por ejemplo, tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079. Tal como también se menciona en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079, la semivida puede expresarse usando parámetros tales como el $t_{1/2}$ -alfa, $t_{1/2}$ -beta y el área bajo la curva (AUC). Se hace referencia, por ejemplo, a la parte experimental a continuación, así como a los manuales convencionales, tales como Kennet, A *et al.*: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y Peters *et al.*, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi y D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª rev. edición (1982). Los términos "aumento en semivida" o "semivida aumentada" tal como también se define en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079 y en particular se refieren a un aumento en el $t_{1/2}$ -beta, o bien con o bien sin un aumento en el $t_{1/2}$ -alfa y/o el AUC o ambos.

q) Con respecto a una diana o un antígeno, el término "sitio de interacción" en la diana o el antígeno significa un sitio, epítipo, determinante antigénico, una parte, un dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o el antígeno que es un sitio para la unión a un ligando, receptor u otra pareja de unión, un sitio catalítico, un sitio de escisión, un sitio para interacción alostérica, un sitio implicado en multimerización (tal como homomerización o heterodimerización) de la diana o el antígeno; o cualquier otro sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o el antígeno que está implicado en un mecanismo o acción biológica de la diana o el antígeno. Más generalmente, un "sitio de interacción" puede ser cualquier sitio, epítipo, determinante antigénico, parte, dominio o tramo de residuos de aminoácido en la diana o el antígeno al que puede unirse una secuencia de aminoácidos o un polipéptido de la invención tal que se modula la diana o el antígeno (y/o cualquier ruta, interacción, señalización, mecanismo biológico o efecto biológico en el que están implicados la diana o el antígeno) (tal como se define en el presente documento).

r) Se dice que un dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido es "específico para" una primera diana o un antígeno en comparación con una segunda diana o antígeno cuando se une al primer antígeno con una afinidad/avidez (tal como se describió anteriormente, y expresado de manera adecuada como un valor de K_D , valor de K_A , velocidad K_{off} y/o velocidad K_{on}) que es al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces, y preferiblemente al menos 1000 veces, y hasta 10.000 veces o más, mejor que la afinidad con la que dicha secuencia de aminoácidos o polipéptido se une a la segunda diana o polipéptido. Por ejemplo, el primer antígeno puede unirse a la diana o el antígeno con un valor de K_D que es al menos 10 veces menos, tal como al menos 100 veces menos, y

preferiblemente al menos 1000 veces menos, tal como 10.000 veces menos o incluso menos que eso, que la K_D con la que dicha secuencia de aminoácidos o polipéptido se une a la segunda diana o polipéptido. Preferiblemente, cuando un dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido es “específico para” una primera diana o antígeno en comparación con una segunda diana o antígeno, se dirige contra (tal como se define en el presente documento) dicha primera diana o antígeno, pero no se dirige contra dicha segunda diana o antígeno.

s) Los términos “bloquear de manera cruzada”, “bloqueado de manera cruzada” y “bloqueo de manera cruzada” se usan de manera intercambiable en el presente documento para significar la capacidad de un dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido para interferir con la unión del ligando natural a su(s) receptor(es). El grado en que un dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido de la invención es capaz de interferir con la unión de otro compuesto tal como el ligando natural a su diana, por ejemplo, CXCR4, y, por tanto, si puede decirse que se bloquea de manera cruzada según la invención, puede determinarse usando ensayos de unión de competición. Un ensayo de bloqueo de manera cruzada cuantitativo particularmente adecuado usa un enfoque basado en ELISA o en FACS o Alphascreen para medir la competición entre el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido marcado (por ejemplo, etiquetado con His o biotinilado) según la invención y el otro agente de unión en cuanto a su unión a la diana. La parte experimental describe generalmente ensayos basados en desplazamiento de Alphascreen, en ELISA o en FACS adecuados para determinar si una molécula de unión se bloquea de manera cruzada o es capaz de bloquear de manera cruzada un dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido según la invención. Se apreciará que el ensayo puede usarse con cualquiera de los dominios variables únicos de inmunoglobulina u otros agentes de unión descritos en el presente documento. Por tanto, en general, una secuencia de aminoácidos de bloqueo de manera cruzada u otro agente de unión según la invención es, por ejemplo, uno que se unirá a la diana en el ensayo de bloqueo de manera cruzada anterior tal que, durante el ensayo y en presencia de una segunda secuencia de aminoácidos u otro agente de unión de la invención, el desplazamiento registrado del dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido según la invención está entre el 60% y el 100% (por ejemplo, en ensayo de competición basado en ELISA/Alphascreen) o entre el 80% y el 100% (por ejemplo, en ensayo de competición basado en FACS) del desplazamiento teórico máximo (por ejemplo, desplazamiento mediante dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido frío (por ejemplo, sin marcar) que necesita bloquearse de manera cruzada) por el agente de bloqueo de manera cruzada que va a someterse a prueba potencialmente que está presente en una cantidad de 0,01 mM o menos (el agente de bloqueo de manera cruzada puede ser otro anticuerpo monoclonal convencional tal como IgG, fragmentos de anticuerpo monovalente clásicos (Fab, scFv)) y variantes diseñadas por ingeniería genética (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, minicuerpos, VHH, dAc, VH, VL).

t) Se dice que una secuencia de aminoácidos tal como, por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido según la invención es un “dominio variable único de inmunoglobulina de tipo VHH1” o “secuencia VHH de tipo 1”, si dicho dominio variable único de inmunoglobulina de tipo VHH1 o secuencia VHH de tipo 1 tiene una identidad del 85% (usando la secuencia consenso de VHH1 como secuencia de consulta y el uso del algoritmo blast con la configuración por defecto, es decir, matriz de puntuación blosum62) con respecto a la secuencia consenso de VHH1
(QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA), y de manera imperativa tiene una cisteína en la posición 50, es decir, C50 (usando la numeración de Kabat).

u) Se dice que una secuencia de aminoácidos tal como, por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido según la invención es “reactiva de manera cruzada” para dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes (tal como albúmina sérica de dos especies diferentes de mamífero, tales como albúmina sérica humana y albúmina sérica de macaco cangrejero) si es específica para (tal como se define en el presente documento) ambos de estos antígenos o determinantes antigénicos diferentes.

v) Tal como se describe adicionalmente en el párrafo q) en las páginas 58 y 59 del documento WO 08/020079, los residuos de aminoácido de un dominio variable único de inmunoglobulina se numeran según la numeración general para dominios VH proporcionada por Kabat *et al.* (“Sequence of proteins of immunological interest”, Servicios de Salud Pública de EE.UU., NIH Bethesda, MD, publicación n.º 91), tal como se aplica a dominios VHH de camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods, 23 de junio de 2000; 240 (1-2): 185-195 (véase, por ejemplo, la figura 2 de esta publicación), y por consiguiente FR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 1-30, CDR1 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 31-35, FR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, CDR2 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 50-65, FR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 66-94, CDR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 95-102, y FR4 de un dominio variable único de inmunoglobulina comprende los residuos de aminoácido en las posiciones 103-113.

w) Las figuras, la lista de secuencias y la parte experimental/ejemplos se proporcionan sólo para ilustrar adicionalmente la invención y no deben interpretarse o entenderse como limitativos del alcance de la invención y/o

de las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera, a menos que se indique de manera explícita de otro modo en el presente documento.

x) La concentración inhibitoria media máxima (CI50) es una medición de la eficacia de un compuesto en la inhibición de una función biológica o bioquímica, por ejemplo un efecto farmacológico. Esta medición cuantitativa indica cuánto del ISV o Nanobody (inhibidor) se necesita para inhibir un procedimiento biológico dado (o componente de un procedimiento, es decir una enzima, célula, un receptor celular, quimiotaxia, anaplasia, metástasis, invasión, etc.) a la mitad. En otras palabras, es la concentración inhibitoria (CI) media máxima (50%) de una sustancia (CI al 50%, o CI50). La CI50 de un fármaco puede determinarse construyendo una curva de respuesta a la dosis y examinando el efecto de diferentes concentraciones de antagonista tal como el ISV o Nanobody de la invención sobre la reversión de la actividad del agonista. Los valores de CI50 pueden calcularse para un antagonista dado tal como el ISV o Nanobody de la invención determinando la concentración necesaria para inhibir la mitad de la respuesta biológica máxima del agonista.

El término concentración eficaz media máxima (CE50) se refiere a la concentración de un compuesto que induce una respuesta intermedia entre el nivel de referencia y el máximo tras un tiempo de exposición especificado. En el presente contexto, se usa como medición de la potencia de un polipéptido, ISV o Nanobody. La CE50 de una curva de respuesta a la dosis graduada representa la concentración de un compuesto en la que se observa el 50% de su efecto máximo. La concentración se expresa preferiblemente en unidades molares.

En sistemas biológicos, pequeños cambios en la concentración de ligando dan como resultado normalmente cambios rápidos en la respuesta, después de una función sigmoidea. El punto de inflexión en el que el aumento en la respuesta con el aumento de la concentración de ligando comienza a disminuir es la CE50. Esto puede determinarse matemáticamente mediante derivación de la línea de mejor ajuste. Basarse en un gráfico para la estimación es conveniente en la mayoría de los casos. En el caso de que se proporcione la CE50 en la sección de ejemplos, los experimentos se diseñaron para reflejar la K_D tan preciso como fuera posible. En otras palabras, los valores de CE50 pueden considerarse entonces como valores de K_D . El término " K_D promedio" se refiere al valor de K_D promedio obtenido en al menos 1, pero preferiblemente más de 1, tal como al menos 2 experimentos. El término "promedio" se refiere al término matemático "promedio" (suma de datos dividido entre el número de elementos en los datos).

También se refiere a CI50, que es una medición de una inhibición del compuesto (inhibición del 50%). Para ensayos de unión de competición y ensayos de antagonistas funcionales, la CI50 es la medición de resumen más común de la curva de respuesta a la dosis. Para ensayos de agonistas/estimuladores, la medición de resumen más común es la CE50.

Polipéptidos biespecíficos

La presente invención se refiere a polipéptidos particulares, también denominados "polipéptidos de la invención" que son tal como se definen por las reivindicaciones y comprenden o consisten esencialmente en (i) un primer bloque de construcción que consiste en un primer dominio variable único de inmunoglobulina, en los que dicho primer dominio variable único de inmunoglobulina se une a una primera diana en la superficie de una célula con baja afinidad, pero cuando se une altera o inhibe una función de dicha primera diana (ISV funcional); y (ii) un segundo bloque de construcción que consiste en un segundo dominio variable único de inmunoglobulina, en los que dicho segundo dominio variable único de inmunoglobulina se une a una segunda diana en la superficie de una célula con alta afinidad, pero cuando se une, altera o inhibe la función de dicha segunda diana preferiblemente sólo de manera mínima (ISV de anclaje). De manera adicional o alternativa, la función de dicha segunda diana es preferiblemente no vital para la célula, por ejemplo, redundante. Por consiguiente, la inhibición de la función de dicha segunda diana (el "anclaje") dará como resultado efectos secundarios y/o toxicidad limitados o insignificantes. No obstante, la inhibición de la función de sólo dicha segunda diana (anclaje) en células normales, es decir, sin la inhibición de la función de dicha primera diana, ya es una reducción significativa de la toxicidad y los efectos secundarios cuando se compara con un tratamiento que usa anticuerpos de alta afinidad contra o bien una o bien ambas dianas. Los polipéptidos de la presente invención proporcionan una inhibición más específica de la proliferación tumoral y la detección o destrucción de las células tumorales que los anticuerpos de la técnica anterior. Los polipéptidos biespecíficos de la invención comprenden al menos dos restos de unión, que son ISV, tales como Nanobodies, en los que al menos el primer resto de unión (ISV funcional) es específico para un antígeno asociado a tumor (por ejemplo, un antígeno expresado en una célula tumoral, también denominado "marcador tumoral"). Los términos polipéptido biespecífico, biespecífico y anticuerpo biespecífico se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones que comprende un primer (funcional) y un segundo (de anclaje) dominio variable único de inmunoglobulina (ISV),

- en el que dicho primer ISV (ISV funcional), se une a una primera diana con una baja afinidad;

- dicho segundo ISV (ISV de anclaje) se une a una segunda diana con una alta afinidad; y

en el que dicha primera diana y dicha segunda diana están presentes en la superficie de una célula y en el que dicha primera diana es diferente de dicha segunda diana, y opcionalmente dicho primer bloque de construcción (bloque de construcción funcional o ISV funcional) y dicho segundo bloque de construcción (bloque de construcción de anclaje o ISV de anclaje) se ligan a través de un ligador.

Los polipéptidos de la invención se diseñan para reducir o alterar una contribución de la primera diana al trastorno, por ejemplo un procedimiento maligno. Los términos "proceso maligno" y "neoplasia maligna" se usan de manera intercambiable en el presente documento. En el presente contexto, neoplasia maligna es la tendencia de un estado médico, especialmente tumores, a empeorar progresivamente y, potencialmente, dar como resultado la muerte. La neoplasia maligna se caracteriza por anaplasia, invasión y/o metástasis. Por tanto, el efecto farmacológico de los polipéptidos de la invención residirá finalmente en la inhibición o alteración de al menos uno, pero preferiblemente más de uno, de anaplasia, invasión, metástasis, proliferación, diferenciación, migración y/o supervivencia de dicha célula. Por tanto, el efecto farmacológico de los polipéptidos de la invención residirá en el aumento o soporte de al menos uno, pero preferiblemente más de uno, de apoptosis, destrucción celular y/o detención del crecimiento de dicha célula. Los fenómenos caracterizados por estos términos se conocen bien en la técnica.

Los polipéptidos biespecíficos o multiespecíficos de la presente invención comprenden o consisten esencialmente en al menos dos bloques de construcción, que son ISV, de los que el primer ISV tiene una afinidad aumentada para su antígeno, es decir la primera diana, tras la unión por el segundo ISV a su antígeno, es decir la segunda diana. Tal afinidad aumentada (afinidad aparente), debido a efectos de avidéz, también se denomina "unión biespecífica o multiespecífica condicional". Tal polipéptido biespecífico o multiespecífico también se denomina "polipéptido biespecífico o multiespecífico de unión de manera condicional de la invención".

Se apreciará que el orden del primer bloque de construcción y el segundo bloque de construcción en el polipéptido (orientación) puede elegirse según las necesidades del experto en la técnica, así como las afinidades relativas que pueden depender de la ubicación de estos bloques de construcción en el polipéptido, y si el polipéptido comprende un ligador, es una cuestión de elección de diseño. Sin embargo, algunas orientaciones, con o sin ligadores, pueden proporcionar características de unión preferidas en comparación con otras orientaciones. Por ejemplo, el orden del primer y el segundo bloque de construcción en el polipéptido de la invención puede ser (desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal): (i) primer bloque de construcción (un primer ISV tal como un primer Nanobody) - [ligador] - segundo bloque de construcción (un segundo ISV tal como un segundo Nanobody); o (ii) segundo bloque de construcción (un segundo ISV tal como un segundo Nanobody) - [ligador] - primer bloque de construcción (un primer ISV tal como un primer Nanobody); (en el que el ligador es opcional). Todas las orientaciones se abarcan por la invención, y los polipéptidos que contienen una orientación que proporciona características de unión deseadas pueden identificarse fácilmente mediante detección rutinaria, por ejemplo tal como se ejemplifica en la sección de ejemplos.

La unión del segundo antígeno por el segundo ISV de anclaje potencia la unión del primer antígeno por el primer ISV funcional de dichos al menos dos ISV, como resultado se aumenta la potencia del primer ISV funcional, tal como Nanobody comprendido en el polipéptido biespecífico, en comparación con el ISV monovalente correspondiente, por ejemplo un Nanobody.

Tal como se usa en el presente documento, el término "potencia" es una medición de la actividad biológica de un agente, tal como un polipéptido, ISV o Nanobody. La potencia de un agente puede determinarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, tal como se describe en esta sección de ejemplos. Los ensayos de potencia basados en cultivos celulares son a menudo el formato preferido para determinar la actividad biológica dado que miden la respuesta fisiológica provocada por el agente y pueden generar resultados dentro de un periodo de tiempo relativamente corto. Pueden usarse diversos tipos de ensayos basados en células basándose en el mecanismo de acción del producto, incluyendo, pero no se limitan a, ensayos de proliferación, ensayos de citotoxicidad, ensayos de genes informadores, ensayos de unión de receptores de la superficie celular y ensayos para medir la inducción/inhibición de una proteína funcionalmente esencial u otra molécula señal (tal como proteínas fosforiladas, enzimas, citocinas, cAMP y similares), todos bien conocidos en la técnica. Los resultados de los ensayos de potencia basados en células pueden expresarse como "potencia relativa" tal como se determina por comparación del polipéptido biespecífico de la invención con la respuesta obtenida para el ISV monovalente de referencia correspondiente, por ejemplo, un polipéptido que comprende sólo un ISV o un Nanobody, que comprende opcionalmente además un Nanobody irrelevante, tal como Cablys (consúltese la sección de ejemplos).

Se dice que un compuesto, por ejemplo el polipéptido biespecífico, es más potente que el compuesto de referencia, por ejemplo el ISV o Nanobody monovalente o monoespecífico correspondiente o el polipéptido que comprende el ISV o Nanobody monovalente o monoespecífico correspondiente, cuando la respuesta obtenida para el compuesto, por ejemplo el polipéptido biespecífico, es al menos 2 veces, pero preferiblemente al menos 3 veces, tal como al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 75 veces, al menos 100 veces, e incluso más preferiblemente incluso al menos 200 veces, o incluso al menos

500 veces, o incluso 1000 veces mejor (por ejemplo, funcionalmente mejor) que la respuesta por el compuesto de referencia, por ejemplo el ISV o Nanobody monovalente correspondiente en un ensayo dado.

La célula de la presente divulgación se refiere en particular a células de mamífero, y preferiblemente a células de primate, e incluso más preferiblemente a células humanas. La célula es preferiblemente una célula cancerosa, en la que dicho cáncer es tal como se define en el presente documento, preferiblemente una leucemia, e incluso más preferiblemente LMA.

La membrana (también denominada membrana plasmática o bicapa fosfolipídica) rodea el citoplasma de una célula, que es el límite exterior de la célula, es decir, la membrana es la superficie de la célula. Esta membrana sirve para separar y proteger una célula de su entorno circundante y está elaborada mayoritariamente de una capa doble de fosfolípidos. Dentro de esta membrana se incrusta una variedad de moléculas de proteína, tales como canales, bombas y receptores celulares. Dado que la membrana es fluida, las moléculas de proteína pueden transportarse dentro de la membrana.

Primer bloque de construcción (bloque de construcción funcional)

Tal como se define por las reivindicaciones, un polipéptido de la invención contiene al menos dos bloques de construcción, que son ISV tales como Nanobodies, de los que el primer ISV, tal como un Nanobody, se dirige contra una primera diana implicada en una enfermedad o un trastorno, tal como una neoplasia maligna, y en particular implicada en una leucemia tal como LMA, e incluso más particularmente contra CXCR4 humano. Preferiblemente, dicha primera diana es única para una célula enferma, por ejemplo, una célula cancerosa, por ejemplo, dicha primera diana no se expresa en una célula normal. Sin embargo, este no será el caso generalmente. En la mayoría de los casos, dicha primera diana estará presente en células tanto normales como enfermas, tales como células cancerosas. Así, para aumentar la especificidad para la célula enferma, por ejemplo, célula cancerosa y/o disminuir los efectos secundarios y la toxicidad debidos a, por ejemplo, la unión a células normales, el primer ISV, tal como un Nanobody, en tales polipéptidos se unirá a dicha primera diana y en particular CXCR4 humano, con avidez aumentada en comparación con el ISV monomérico o monovalente correspondiente, tal como un Nanobody, cuando está presentes tanto la primera como la segunda diana en una célula, preferiblemente una célula cancerosa (formato *cis*). Cuando se une a la primera diana, dicho primer ISV funcional, tal como un Nanobody, inhibirá una función de dicha primera diana.

Una función de una diana se refiere a cualquier cambio en una propiedad biológica o bioquímica medible provocada por dicha diana, incluyendo cambios fisiológicos de la célula tales como cambios en proliferación, diferenciación, anaplasia, invasión, metástasis, migración, supervivencia, apoptosis, procedimiento de transporte, metabolismo, motilidad, liberación de citocinas, composición de citocinas, segundos mensajeros, enzimas, receptores, etc. Preferiblemente, la función de una diana se determina mediante ensayos de potencia basados en cultivos celulares tal como se describió anteriormente.

Se apreciará que debido a su baja afinidad, la función de dicho primer ISV, tal como un Nanobody, no puede someterse a prueba o determinarse directamente en todos los casos. No obstante, los presentes inventores demostraron que no es posible someter a prueba agentes de unión de baja afinidad que alteran o inhiben la función de sus dianas relacionadas (véase la sección de ejemplos). Por ejemplo, los presentes inventores usaron miembros de familia de un miembro de alta afinidad previamente identificado y lo mutaron con el fin de disminuir la afinidad. Usando miembros de familia, se determinó que se unía el mismo epítipo en la diana. El término "familia" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un grupo de ISV, Nanobody y/o secuencias de VHH que tienen longitudes idénticas (es decir, tienen el mismo número de aminoácidos dentro de su secuencia) y de las que la secuencia de aminoácidos entre la posición 8 y la posición 106 (según la numeración de Kabat) tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 89% o más. Los miembros de familia se derivan de un progenitor común durante el procedimiento de maduración de células B.

Cuando, al diseñar los polipéptidos de la invención, el primer ISV se elige por su baja afinidad *per se*, sin tener en cuenta la influencia de cualquier efecto de avidez.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV se une a una primera diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 200 nM, tal como un valor de K_D promedio de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 nM, o 200 nM. La K_D se determina mediante SPR.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV tiene una baja afinidad cuando se mide como monovalente.

La presente invención también se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV se une a una primera diana en la superficie de una célula con un valor de CE50 de entre 1 nM y 200 nM, tal como un valor de CE50 promedio de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120,

130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 ó 200 nM.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se describe en el presente documento, en el que dicha CE50 promedio se mide en células que comprenden dicha diana 1 pero que carecen sustancialmente de dicha diana 2.

La presente invención también se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicha K_D promedio se determina (indirectamente) mediante SPR.

El primer ISV puede dirigirse, por ejemplo, contra un primer determinante antigénico, epítipo, parte, dominio, subunidad o confirmación (cuando sea aplicable) de dicha primera diana, tal como, por ejemplo, una tirosina cinasa receptora (RTK) o un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) que participa en una neoplasia maligna, y en particular CXCR4 humano (OMIM 162643). Si el primer ISV, tal como un Nanobody, se une a dicha primera diana, se altera o inhibe una función de dicha primera diana.

La primera diana del polipéptido de la invención puede ser cualquier diana tal como se define por las reivindicaciones, tal como un receptor celular, en la superficie de una que se sabe que participa en una neoplasia maligna.

Por ejemplo, las tirosina cinasas receptoras (RTK) y las rutas de transducción de señales mediadas por RTK están implicadas en el inicio tumoral, el mantenimiento, la angiogénesis y la proliferación vascular. Se han identificado aproximadamente 20 clases de RTK diferentes, de las que las más extensivamente estudiadas son: 1. RTK clase I (familia de receptor de EGF) (familia ErbB), 2. RTK clase II (familia de receptor de insulina), 3. RTK clase III (familia de receptor de PDGF), 4. RTK clase IV (familia de receptor de FGF), 5. RTK clase V (familia de receptores de VEGF), 6. RTK clase VI (familia de receptor de HGF), 7. RTK clase VII (familia de receptor de Trk), 8. RTK clase VIII (familia de receptor de Eph), 9. RTK clase IX (familia de receptor de AXL), 10. RTK clase X (familia de receptor de LTK), 11. RTK clase XI (familia de receptor de TIE), 12. RTK clase XII (familia de receptor de ROR), 13. RTK clase XIII (familia de receptor de DDR), 14. RTK clase XIV (familia de receptor de RET), 15. RTK clase XV (familia de receptor de KLG), 16. RTK clase XVI (familia de receptor de RYK), 17. RTK clase XVII (familia de receptor de MuSK). En particular, dianas tales como receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), c-Met, HER3, plexinas, integrinas, CD44, RON y en receptores implicados en rutas tales como la proteína (MAP)-cinasa activada por Ras/Raf/mitógeno y fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K)/Akt/diana de mamífero de las rutas de rapamicina (mTOR).

Además, se produce una estrecha relación operacional entre GPCR y otros receptores que responden a factores de crecimiento. La señalización de GPCR puede preceder, seguir, ir en paralelo o sinergizar la señalización de receptores para esteroides, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), etc. En cánceres de pulmón, gástrico, colorrectal, de páncreas y de próstata, se promueve la estimulación sostenida de GPCR mediante bucles activadores autocrinos y paracrinos.

Existen dos rutas de transducción de señales principales que implican a los receptores acoplados a proteínas G: la ruta de señales de cAMP y la ruta de señales de fosfatidilinositol, ambas de las cuales pueden participar en una neoplasia maligna. Cuando se une un ligando al GPCR, provoca un cambio conformacional en el GPCR, que le permite actuar como factor de intercambio de nucleótido guanina (GEF). Entonces, el GPCR puede activar una proteína G asociada intercambiando su GDP unido por un GTP. Entonces, la subunidad α de la proteína G, junto con el GTP unido, puede disociarse de las subunidades β y γ para afectar adicionalmente a las proteínas de señalización intracelular o proteínas funcionales diana directamente dependiendo del tipo de subunidad α (G α s, G α i/o, G α q/11, G α 12/13). Así, las funciones finales de dicha primera diana son transducción de señales, por ejemplo la transmisión y el procesamiento de señales desde el entorno exterior al interior de la célula, tras lo cual la célula reacciona. En células cancerosas, se altera el procedimiento normal.

Preferiblemente, la primera diana se elige de receptor de dominio de discoidina (DDR), una tirosina cinasa receptora que se distingue por un dominio extracelular único homólogo a la lectina discoidina I (antígeno CD167a), DDR2, ErbB-1, C-erbB-2, FGFR-1, FGFR-3, antígeno CD135, antígeno CD 117, proteína tirosina cinasa-1, c-Met, antígeno CD148, C-ret, ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, antígeno CD202b, Trk-A, Trk-B, Trk-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, receptor Notch 1-4, receptor FAS, DR5, DR4, CD47, CX3CR1, CXCR-3, CXCR-4, CXCR-7, proteína 2 de unión a quimiocina, y CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a polipéptidos de la invención en los que el primer ISV, tal como un Nanobody, inhibe o altera al menos una función, preferiblemente más de una, y lo más preferiblemente todas las funciones de dicha primera diana.

Preferiblemente, el primer ISV se dirige contra un sitio de interacción de dicha primera diana, alterado de ese modo una función de dicha primera diana. Un sitio de interacción preferido para la unión por el primer ISV es un sitio de

unión a ligando en la primera diana. Por ejemplo, la unión del ISV anti-CXCR4 puede inhibir o desplazar la unión del ligando relacionado, es decir, SDF-1 (también conocido como CXCL12), para CXCR4. Además, cuando la primera diana forma parte de un par de unión (por ejemplo, un par de unión receptor-ligando), los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos pueden ser tal que compiten con las parejas de unión relacionadas, por ejemplo, SDF-1 para la unión con CXCR4 o HGF para la unión a c-Met, y/o tal que neutralizan (completa o parcialmente) la unión de la pareja de unión relacionada a la diana. Además, cuando un ligando, por ejemplo SDF-1 se asocia con otras proteínas o polipéptidos, tal como para formar complejos proteicos (por ejemplo, con CXCR4), se encuentra dentro del alcance de la invención que los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención se unan al receptor asociado con su ligando, por ejemplo SDF-1 asociado con CXCR4, siempre que se altere una función del receptor. En todos estos casos, los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención pueden unirse a tales complejos proteicos asociados con una afinidad y/o especificidad que puede ser igual que o diferente de (es decir, mayor que o menor que) la afinidad y/o especificidad con la que los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención se unen a la diana celular, por ejemplo receptor, y en particular CXCR4 humano en su estado no asociado, de nuevo siempre que se inhiba una función de la primera diana.

Dado que diversos receptores de la superficie celular requieren dimerización para su activación, se prefiere que en tales casos el primer ISV se una a estos sitios de dimerización, tales como sitios de homo o heterodimerización, inhibiendo o previniendo de ese modo la dimerización y, por tanto, la señalización por el par de receptores.

Además, la mayoría de receptores existen en diversas conformaciones, por ejemplo, la conformación relajada se une a sustratos fácilmente, mientras que tras la unión de un sustrato se cambia la conformación permitiendo la señalización. Por consiguiente, el primer ISV también puede alterar la función de la primera diana por efectos alostéricos. Por ejemplo, la unión del primer ISV previene que la primera diana experimente cambios conformacionales, inhibiendo de ese modo la señalización.

Ventajosamente, dado que los constructos biespecíficos de la invención se dirigen contra dos dianas diferentes, se impide la dimerización accidental y, por tanto, la señalización.

También se espera que los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención se unirán generalmente a todos los análogos, las variantes, los mutantes, los alelos, las partes y los fragmentos sintéticos o que se producen de manera natural de sus dianas; o al menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de CXCR4 y en particular CXCR4 humano que contengan uno o más determinantes antigénicos o epítomos que son esencialmente los mismos que el/los determinante(s) antigénico(s) o epítomo(s) al/a los que los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención que se unen a CXCR4 y en particular a CXCR4 humano. De nuevo, en un caso de este tipo, los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención pueden unirse a tales análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que son las mismas que, o que son diferentes de (es decir, mayor que o menor que), la afinidad y especificidad con la que los dominios variables únicos de inmunoglobulina se unen a CXCR4 (de tipo natural), siempre que se inhiba una función de CXCR4.

La inhibición de una(s) función/funciones de la primera diana puede determinarse mediante cualquier ensayo adecuado conocido por el experto en la técnica, tal como ELISA, FACS, análisis de Scatchard, Alphascreen, SPR, ensayos funcionales, etc.

La eficacia o potencia de los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención, y de composiciones que comprenden los mismos, puede someterse a prueba usando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o el trastorno específico implicado. Los ensayos y modelos animales adecuados serán evidentes para el experto en la técnica, y por ejemplo incluyen ensayos de desplazamiento de ligandos (Burgess *et al.*, Cancer Res 2006 66:1721-9), ensayos de dimerización (documento WO2009/007427A2, Goetsch, 2009), ensayos de señalización (Burgess *et al.*, Mol Cancer Ther 9:400-9), ensayos de proliferación/supervivencia (Pacchiana *et al.*, J Biol Chem, septiembre de 2010 M110.134031), ensayos de adhesión celular (Holt *et al.*, Haematologica 2005 90:479-88) y ensayos de migración (Kong-Beltran *et al.*, Cancer Cell 6:75-84), ensayos de brotación de células endoteliales (Wang *et al.*, J Immunol. 2009; 183:3204-11) y modelos de xenoinjerto *in vivo* (Jin *et al.*, Cancer Res. 2008 68:4360-8), así como los ensayos y modelos animales usados en la parte experimental a continuación y en la técnica anterior citada en el presente documento. Un medio para expresar la inhibición de dicha primera diana es mediante la CI50.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV tiene una CI50 de entre 200 nM y 1 nM, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 ó 200 nM, por ejemplo determinada en un ensayo de competición de ligandos, un ensayo celular funcional, tal como inhibición de quimiotaxia inducida por ligandos, un ensayo Alphascreen, etc.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV inhibe la unión de un ligando natural a dicha primera diana, tal como por ejemplo SDF-1 a CXCR4 en aproximadamente el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o incluso el 100%, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho primer ISV.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV inhibe el efecto farmacológico, por ejemplo, anaplasia, invasión, metástasis, proliferación, diferenciación, migración y/o supervivencia, en el que dicha primera diana se implica en aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o incluso el 100%, por ejemplo, con respecto al efecto farmacológico en ausencia de dicho primer ISV.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV aumenta la apoptosis, la destrucción celular y/o la detención del crecimiento de dicha célula, en el que dicha primera diana se implica en aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o incluso el 100%, por ejemplo, con respecto al aumento en ausencia de dicho primer ISV.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV desplaza aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o más del ligando natural a dicha primera diana, por ejemplo, con respecto al desplazamiento en ausencia de dicho primer ISV.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV inhibe la señalización por dicha primera diana, por ejemplo, la actividad cinasa de dicha primera diana, en aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o incluso el 100%, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho primer ISV.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV inhibe la dimerización de dicha primera diana en aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o incluso el 100%, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho primer ISV.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho primer ISV inhibe la quimiotaxis en aproximadamente el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o incluso el 100% en un ensayo quimiotáctico, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho primer ISV.

Segundo bloque de construcción (bloque de construcción de anclaje)

El segundo bloque de construcción, que es un ISV, tal como un Nanobody o VHH, tiene una alta afinidad por su, la segunda, diana. El segundo ISV puede dirigirse, por ejemplo, contra un determinante antigénico, un epítipo, una parte, un dominio, una subunidad o una confirmación (cuando sea aplicable) de dicha segunda diana. El segundo ISV, tal como Nanobody o VHH, se elige por su alta afinidad para su diana *per se*, sin tener en cuenta la influencia de cualquier efecto de aidez.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV se une a una segunda diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 0,1 pM, tal como a un valor de K_D promedio de 10 nM o menos, incluso más preferiblemente a un valor de K_D promedio de 9 nM o menos, tal como menos de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 nM o incluso menos, tal como menos de 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 pM o incluso menos, tal como menos de 0,4 pM. La K_D se determina mediante SPR.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV tiene una alta afinidad cuando se mide como monovalente.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicha K_D promedio se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en una proteína recombinante.

La presente invención también se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV se une a una segunda diana en la superficie de una célula con un valor de CE_{50} de entre 10 nM y 0,1 pM, tal como a un valor de K_D promedio de 10 nM o menos, incluso más preferiblemente a un valor de K_D promedio de 9 nM o menos, tal como menos de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 nM o incluso menos, tal como menos de 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 pM o incluso menos, tal como menos de 0,4 pM.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el

que dicha CE50 promedio se mide en células que comprenden dicha diana 2 pero que carecen sustancialmente de dicha diana 1.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicha K_D promedio se determina mediante Biacore en un segundo ISV monovalente, tal como un Nanobody, o un polipéptido que comprende un segundo ISV monovalente, tal como un Nanobody.

Se ha demostrado en los ejemplos que la K_D se correlaciona bien con la CE50.

10 Dicha segunda diana puede ser cualquier diana en una célula tal como se define por las reivindicaciones, por ejemplo CD123 (OMIM: 308385), siempre que sea diferente de dicha primera diana. Preferiblemente, dicha segunda diana es única para dicha célula enferma, por ejemplo, una célula cancerosa. Por ejemplo, dicha segunda diana no se expresa en una célula sana normal. Sin embargo, este no será el caso generalmente. En la mayoría de casos, dicha segunda diana estará presente en células tanto normales como enfermas, por ejemplo, células cancerosas.
15 Aunque la función de dicha segunda diana puede no ser vital para dichas células, la inhibición de su función en células normales puede dar lugar a alguna toxicidad y efectos secundarios. La presente invención se refiere además a agentes de unión de alta afinidad comprendidos en el polipéptido de la invención que sólo alteran o inhiben mínimamente o no la función de células normales.

20 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV se une a un sitio alostérico de dicha segunda diana.

25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV no inhibe sustancialmente o sólo marginalmente una función de dicha segunda diana, por ejemplo, como monovalente.

30 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV tiene una CI_{50} de entre 100 nM y 10 μ M, tal como 200 nM, 500 nM, 1 μ M o 5 μ M, en un ensayo Alphascreen, ELISA de competición o FACS en células tal como se describe, por ejemplo, en la parte experimental.

35 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV inhibe la unión de un ligando natural a dicha segunda diana en menos de aproximadamente el 50%, tal como el 40%, el 30% o el 20% o incluso menos del 10%, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho segundo ISV.

40 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV inhibe el efecto farmacológico de dicha segunda diana en menos de aproximadamente el 50%, tal como el 40%, el 30% o el 20% o incluso menos del 10%, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho segundo ISV.

45 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV desplaza el ligando natural a dicha segunda diana en menos de aproximadamente el 50%, tal como el 40%, el 30% o el 20% o incluso menos del 10%, por ejemplo, con respecto al desplazamiento en ausencia de dicho segundo ISV.

50 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV inhibe la señalización por dicha segunda diana en menos de aproximadamente el 50%, tal como el 40%, el 30% o el 20% o incluso menos del 10%, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho segundo ISV.

55 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV inhibe la dimerización de dicha primera diana en menos de aproximadamente el 50%, tal como el 40%, el 30% o el 20% o incluso menos del 10%, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho segundo ISV.

60 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicho segundo ISV inhibe la quimiotaxia en menos de aproximadamente el 50%, tal como el 40%, el 30% o el 20% o incluso menos del 10% en un ensayo quimiotáctico, por ejemplo, con respecto a la inhibición en ausencia de dicho segundo ISV.

Combinaciones

65 Con el fin de aumentar la especificidad y, por tanto, minimizar los efectos secundarios y/o la toxicidad, la segunda diana de anclaje es preferiblemente un antígeno asociado a tumor (AAT). Los AAT son normalmente antígenos que

se expresan en células de tumores particulares, pero que no se expresan normalmente en células normales. A menudo, los AAT son antígenos que se expresan normalmente en células sólo en puntos particulares en el desarrollo de un organismo (tal como durante el desarrollo fetal) y que se expresan de manera inapropiada en el organismo en el presente punto de desarrollo, o son antígenos no expresados en tejidos o células normales de un órgano que expresa ahora el antígeno. Los AAT preferidos como segunda diana de anclaje incluyen MART-1, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), gp100, MAGE-1, HER-2 y antígenos de Lewis^Y.

Los antígenos de la superficie celular que se expresan preferentemente en LSC de LMA en comparación con células madre hematopoyéticas normales, y por tanto preferidos como segunda diana, incluyen CD123, CD44, CLL-1, CD96, CD47, CD32, CXCR4, Tim-3 y CD25.

Otros antígenos asociados a tumor adecuados como segunda diana dentro de los polipéptidos de la invención incluyen: TAG-72, Ep-CAM, PSMA, PSA, glicolípidos tales como GD2 y GD3.

Las segundas dianas de anclaje de la invención también incluyen antígenos de diferenciación hematopoyética, es decir, glicoproteínas asociadas normalmente con el agrupamiento de grupos de diferenciación (CD), tales como CD4, CD5, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD45, CD52 y CD147; y receptores de citocinas incluyendo cadena gamma del receptor de interleucina-2 (antígeno CD132); cadena alfa del receptor de interleucina-10 (IL-10R-A); cadena beta del receptor de interleucina-10 (IL-10R-B); cadena beta-1 del receptor de interleucina-12 (IL-12R-beta1); cadena beta-2 del receptor de interleucina-12 (beta-2 del receptor de IL-12); cadena alfa-1 del receptor de interleucina-13 (IL-13R-alfa-1) (antígeno CD213 al); cadena alfa-2 del receptor de interleucina-13 (proteína de unión a interleucina-13); receptor de interleucina-17 (receptor de IL-17); receptor de interleucina-17B (receptor de IL-17B); precursor del receptor de interleucina-21 (IL-21R); receptor de interleucina-1, tipo I (IL-1R-1) (CD121a); receptor de interleucina-1, tipo II (IL-1R-beta) (CDw121b); proteína antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra); cadena alfa del receptor de interleucina-2 (antígeno CD25); cadena beta del receptor de interleucina-2 (antígeno CD122); cadena alfa del receptor de interleucina-3 (IL-3R-alfa) (antígeno CD123).

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicha segunda diana de anclaje se elige del grupo que consiste en MART-1, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), gp100, MAGE-1, HER-2 y antígenos de Lewis^Y, CD123, CD44, CLL-1, CD96, CD47, CD32, CXCR4, Tim-3, CD25, TAG-72, Ep-CAM, PSMA, PSA, GD2, GD3, CD4, CD5, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD45, CD52 y CD147; y receptores de citocinas incluyendo cadena gamma del receptor de interleucina-2 (antígeno CD132); cadena alfa del receptor de interleucina-10 (IL-10R-A); cadena beta del receptor de interleucina-10 (IL-10R-B); cadena beta-1 del receptor de interleucina-12 (IL-12R-beta1); cadena beta-2 del receptor de interleucina-12 (beta-2 del receptor de IL-12); cadena alfa-1 del receptor de interleucina-13 (IL-13R-alfa-1) (antígeno CD213 al); cadena alfa-2 del receptor de interleucina-13 (proteína de unión a interleucina-13); receptor de interleucina-17 (receptor de IL-17); receptor de interleucina-17B (receptor de IL-17B); precursor del receptor de interleucina-21 (IL-21R); receptor de interleucina-1, tipo I (IL-1R-1) (CD121a); receptor de interleucina-1, tipo II (IL-1R-beta) (CDw121b); proteína antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra); cadena alfa del receptor de interleucina-2 (antígeno CD25); cadena beta del receptor de interleucina-2 (antígeno CD122); cadena alfa del receptor de interleucina-3 (IL-3R-alfa) (antígeno CD123).

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

Tal como se usa en el presente documento "receptor del factor de crecimiento epidérmico" (EGFR, ErbB1, HER1) se refiere a proteínas de EGFR de mamífero endógenas o que se producen de manera natural y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de una proteína de EGFR de mamífero correspondiente

endógena o que se produce de manera natural (por ejemplo, proteínas recombinantes, proteínas sintéticas (es decir, producidas usando los métodos de la química orgánica de síntesis)). Por consiguiente, tal como se define en el presente documento, el término incluye proteína de EGFR madura, variantes polimorfas o alélicas y otras isoformas de un EGFR (por ejemplo, producidas mediante corte y empalme alternativo u otros procedimientos celulares), y formas modificadas o sin modificar de lo anterior (por ejemplo, lipidadas, glicosiladas). Los EGFR endógenos o que se producen de manera natural incluyen proteínas de tipo natural tales como variantes maduras, polimorfas o alélicas de EGFR y otras isoformas que se producen de manera natural en mamíferos (por ejemplo, humanos, primates no humanos). Tales proteínas pueden recuperarse o aislarse a partir de una fuente que produce de manera natural EGFR, por ejemplo. Estas proteínas y proteínas que tienen la misma secuencia de aminoácidos que un EGFR correspondiente endógeno o que se produce de manera natural, se denominan con el nombre del mamífero correspondiente. Por ejemplo, cuando el mamífero correspondiente es un humano, la proteína se denomina EGFR humano. Un ISV (por ejemplo, Nanobody) que inhibe la unión de EGF y/o TGF alfa a EGFR inhibe la unión en el ensayo de unión a EGFR o ensayo de cinasa para EGFR descritos en el presente documento con una CI50 de aproximadamente 1 [μM] o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se describe en el presente documento, en el que dicha primera diana (diana funcional) y dicha segunda diana (diana de anclaje) se eligen del grupo que consiste en

diana funcional	diana de anclaje
RTK	AAT
GPCR	AAT
CXCR4 (OMIM: 162643)	CD123 (OMIM: 308385)
DR5 (OMIM: 603612)	EpCam (OMIM: 185535)
DR4 (OMIM: 126452)	EpCam (OMIM: 185535)
CD95 (OMIM: 134637)	EpCam (OMIM: 185535)
CD47 (OMIM: 601028)	CD123 (OMIM: 308385)
CD47 (OMIM: 601028)	EpCam (OMIM: 185535)
EGFR (OMIM: 131550)	CEA (OMIM: 114890)
CXCR4 (OMIM: 162643)	CD4 (OMIM/ 186940)
IL12Rβ1 (OMIM: 601604)	CD4 (OMIM/ 186940)
IL12Rβ2 (OMIM: 601642)	CD4 (OMIM/ 186940)
IL23R (OMIM: 605580)	CD4 (OMIM/ 186940)

En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido según la invención, en el que dicha primera diana y dicha segunda diana se eligen del grupo que consiste en:

- tirosina cinasa receptora como primera diana y un antígeno asociado a tumor (AAT) como segunda diana;
- receptor acoplado a proteínas G (GPCR) como primera diana y un antígeno de diferenciación hematopoyética como segunda diana;
- tirosina cinasa receptora como primera diana y un antígeno de diferenciación hematopoyética como segunda diana;
- receptor acoplado a proteínas G (GPCR) como primera diana y un antígeno asociado a tumor (AAT) como segunda diana;
- CXCR4 como primera diana y CD123 como segunda diana;
- DR5 como primera diana y EpCam como segunda diana;
- DR4 como primera diana y EpCam como segunda diana;
- CD95 como primera diana y EpCam como segunda diana;
- CD47 como primera diana y CD123 como segunda diana;
- CD47 como primera diana y EpCam como segunda diana;
- EGFR como primera diana y CEA como segunda diana

- CD4 como primera diana y CXCR4 como segunda diana

- IL12R β 1 como primera diana y CD4 como segunda diana

5 - IL12R β 2 como primera diana y CD4 como segunda diana, y

- IL23R como primera diana y CD4 como segunda diana.

10 Los presentes inventores también han demostrado que una primera diana puede convertirse en una segunda diana y viceversa, dependiendo de la afinidad y las propiedades funcionales de los ISV respectivos (véase, por ejemplo, los ISV que se unen a CXCR4).

15 Los presentes inventores demostraron además que el número de copia absoluto de la primera y la segunda diana, pero también la razón de la primera diana y la segunda diana, en la superficie celular puede ser un determinante en la especificidad de la unión final, y por tanto en la toxicidad y/o los efectos secundarios. Preferiblemente, está presente un número de copias bajo de dicha primera diana funcional. Preferiblemente, está presente un número de copias alto de dicha segunda diana de anclaje. Incluso más preferiblemente, está presente una razón baja de la primera diana funcional y la segunda diana de anclaje en el número de superficie celular.

20 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicha célula comprende entre 1.000 y 40.000 copias, tal como entre 10.000 y 20.000 copias de dicha primera diana en la superficie de dicha célula.

25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicha célula comprende entre 40.000 y 100.000 copias, tal como entre 60.000 y 80.000 copias de dicha segunda diana en la superficie de dicha célula.

30 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido tal como se define por las reivindicaciones, en el que dicha célula comprende una razón de 0,01 a 0,9 de dicha primera diana funcional y dicha segunda diana de anclaje, incluso más preferiblemente entre 0,2 y 0,8, entre 0,3 y 0,7, entre 0,4 y 0,6, tal como una razón de 0,02, 0,05, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, preferiblemente una razón de 0,5.

35 Como tal, los polipéptidos y las composiciones de la presente invención pueden usarse para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos de la presente invención (también en el presente documento "enfermedades y trastornos de la presente divulgación") que incluyen, pero no se limitan a, cáncer. El término "cáncer" se refiere al estado patológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por proliferación o supervivencia celular desregulada. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas: cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, mieloma múltiple (incluyendo gammapatía monoclonal de significancia indeterminada, mieloma asintomático y sintomático), cáncer de próstata, y linfoma de Burkitt, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer hepatobiliar, cáncer de vesícula biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de recto, cáncer riñón, cáncer vejiga, cáncer próstata, cáncer de pene, cáncer de uretra, cáncer de testículo, cáncer de vagina, cáncer de útero, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de glándulas suprarrenales, cáncer endocrino de páncreas, cáncer carcinoide, cáncer de hueso, cáncer de piel, retinoblastomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado con SIDA, tumores neuroectodérmicos, rhabdomyosarcoma (véase, por ejemplo, *Cancer, Principles and practice* (DeVita, V.T. *et al.* eds 1997) para cánceres adicionales); así como cualquier metástasis de cualquiera de los cánceres anteriores, así como indicaciones no cancerosas tales como poliposis nasal; así como otros trastornos y enfermedades descritos en el presente documento. En particular, los polipéptidos y las composiciones de la presente invención pueden usarse para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades que implican metástasis mediada por EGFR, quimiotaxia, adhesión celular, migración transendotelial, proliferación y/o supervivencia celulares. Los cánceres caracterizados por la expresión de EGFR en la superficie de células cancerosas (cánceres que expresan EGFR) incluyen, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal y cáncer de vesícula biliar.

60 Para una descripción general de dominios variables únicos de inmunoglobulina, se hace referencia a la descripción adicional a continuación, así como a la técnica anterior citada en el presente documento. A este respecto, sin embargo, cabe destacar que esta descripción y la técnica anterior describen principalmente dominios variables únicos de inmunoglobulina de la denominada "clase V_H3" (es decir, dominios variables únicos de inmunoglobulina con un alto grado de homología de secuencia con respecto a secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H3 tales como DP-47, DP-51 o DP-29), que forman un aspecto preferido de esta divulgación. Sin embargo, cabe destacar que la divulgación en su sentido más amplio cubre generalmente cualquier tipo de dominios variables

únicos de inmunoglobulina y, por ejemplo, también cubre los dominios variables únicos de inmunoglobulina que pertenecen a la denominada "clase V_H4" (es decir, dominios variables únicos de inmunoglobulina con un alto grado de homología de secuencia con respecto a secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H4 tales como DP-78), tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 07/118670.

Generalmente, dominios variables únicos de inmunoglobulina (en particular secuencias de V_{HH} y dominios variables únicos de inmunoglobulina optimizados por secuencia) pueden caracterizarse, en particular, por la presencia de uno o más "residuos de sello distintivo" (tal como se describe en el presente documento) en una o más de las secuencias de entramado (de nuevo tal como se describe adicionalmente en el presente documento).

Por tanto, generalmente, un dominio variable único de inmunoglobulina puede definirse como una secuencia de aminoácidos con la estructura (general) (consúltese la fórmula 1 a continuación)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente.

En un aspecto preferido, la invención proporciona polipéptidos que comprenden al menos un dominio variable único de inmunoglobulina que es una secuencia de aminoácidos con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones de entramado 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que:

i) al menos uno de los residuos de aminoácido en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se elige de los residuos de sello distintivo mencionados en la tabla A-1 a continuación; y en la que:

ii) dicha secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, más preferiblemente el 90%, incluso más preferiblemente el 95% con al menos uno de los dominios variables únicos de inmunoglobulina tal como se muestra en el documento WO 2009/138519 (véanse las SEQ ID NO: 1 a 125 en el documento WO 2009/138519), en el que con fines de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácido que forman las secuencias de CDR (indicados con X en las secuencias) no se tienen en cuenta; y en la que:

iii) las secuencias de CDR son generalmente tal como se definen adicionalmente en el presente documento (por ejemplo, la CDR1, CDR2 y CDR3 en una combinación tal como puede determinarse con la información proporcionada en el presente documento, destacando que las definiciones de CDR se calculan según el sistema de numeración de Kabat).

Tabla A-1: residuos de sello distintivo en V_{HH}

Posición	V _H 3 humana	Residuos de sello distintivo
11	L, V; predominantemente L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferiblemente L
37	V, I, F; normalmente V	F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F ⁽¹⁾ o Y
44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; preferiblemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q ⁽³⁾ ; lo más preferiblemente G ⁽²⁾ o Q ⁽³⁾
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾
47 ⁽⁸⁾	W, Y	F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ o W ⁽²⁾ , G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾
83	R o K; normalmente R	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; lo más preferiblemente K
84	A, T, D; predominantemente A	P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P
103	W	W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; preferiblemente W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G
108	L, M o T; predominantemente L	Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L ⁽⁷⁾
Notas:		
⁽¹⁾ En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE o KQRE en las posiciones 43-46.		

(2) Normalmente como GLEW en las posiciones 44-47.

(3) Normalmente como KERE o KQRE en las posiciones 43-46, por ejemplo, como KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW o KQREG en las posiciones 43-47. Alternativamente, también son posibles secuencias tales como TERE (por ejemplo, TEREL), TQRE (por ejemplo, TQREL), KECE (por ejemplo, KECER), KQCE (por ejemplo, KQCEL), RERE (por ejemplo, REREG), RQRE (por ejemplo, RQREL, RQREF o RQREW), QERE (por ejemplo, QEREG), QQRE, (por ejemplo, QQREW, QQREL o QQREF), KGRE (por ejemplo, KGREG), KDRE (por ejemplo, KDREV). Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas, incluyen, por ejemplo, DECKL y NVCEL.

(4) Con tanto GLEW en las posiciones 44-47 como KERE o KQRE en las posiciones 43-46.

(5) A menudo como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios V_{HH} que se producen de manera natural.

(6) En particular, pero no exclusivamente, en combinación con GLEW en las posiciones 44-47.

(7) Con la condición de que cuando las posiciones 44-47 son GLEW, la posición 108 es siempre Q en secuencias de V_{HH} (no humanizado) que también contienen un W en 103.

(8) El grupo GLEW también contiene secuencias similares a GLEW en las posiciones 44-47, tales como, por ejemplo, GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER y ELEW.

De nuevo, tales dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden derivarse de cualquier manera adecuada y de cualquier fuente adecuada, y, por ejemplo, pueden ser secuencias de V_{HH} que se producen de manera natural (es decir, de una especie adecuada de camélido, por ejemplo, llama) o V_H o V_L sintéticos o semisintéticos (por ejemplo, de humano). Tales dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden incluir V_{HH} "humanizados" u "optimizados por secuencia" de otro modo, secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (y en particular secuencias de dominio variable de cadena pesada camelizadas, es decir, V_H camelizadas), así como V_H humanos, V_L humanos, V_{HH} camélidos que se han alterado mediante técnicas tales como maduración por afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o que se producen de manera natural), injerto de CDR, remodelación de superficie, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR usando cebadores de solapamiento y técnicas similares para diseñar por ingeniería genética secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por el experto en la técnica; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de lo anterior tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Tal como se menciona en el presente documento, una clase particularmente preferida de dominios variables únicos de inmunoglobulina comprende dominios variables únicos de inmunoglobulina con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} que se produce de manera natural, pero que se ha "humanizado", es decir mediante el reemplazo de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de V_{HH} que se produce de manera natural (y en particular en las secuencias de entramado) por uno o más de los residuos de aminoácido que se producen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio V_H de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (por ejemplo, tal como se indicó anteriormente). Esto puede realizarse de una manera conocida *per se*, que resultará evidente para el experto en la técnica, por ejemplo, basándose en la descripción adicional en el presente documento y la técnica anterior sobre humanización denominada en el presente documento. De nuevo, cabe destacar que tales dominios variables únicos de inmunoglobulina humanizados pueden obtenerse de cualquier manera conocida *per se* y, por tanto, no están estrictamente limitados a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_{HH} que se produce de manera natural como material de partida.

Otra clase particularmente preferida de dominios variables únicos de inmunoglobulina comprende dominios variables únicos de inmunoglobulina con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H que se produce de manera natural, pero que se ha "camelizado", es decir, mediante el reemplazo de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H que se produce de manera natural a partir de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos de aminoácido que se producen en la(s) posición/posiciones correspondiente(s) en un dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada. Esto puede realizarse de manera conocida *per se*, que resultará evidente para el experto en la técnica, por ejemplo, basándose en la descripción en el presente documento. Tales sustituciones "camelizantes" se insertan preferiblemente en las posiciones de aminoácido que forman y/o están presentes en la superficie de contacto V_H - V_L , y/o en los denominados residuos de sello distintivo de *Camelidae*, tal como se define en el presente documento (véanse también, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). Preferiblemente, la secuencia de V_H que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar los dominios variables únicos de inmunoglobulina camelizados es preferiblemente una secuencia de V_H de un mamífero, más preferiblemente la secuencia de V_H de un ser humano, tal como una secuencia de V_{H3} . Sin embargo, cabe destacar que tales dominios variables únicos de inmunoglobulina camelizados pueden obtenerse de cualquier manera conocida *per se* y, por tanto, no están estrictamente limitados a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_H que se produce de manera natural como material de partida.

Por ejemplo, de nuevo tal como se describe adicionalmente en el presente documento, tanto la “humanización” como la “camelización” pueden realizarse proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio V_{HH} o un dominio V_H que se producen de manera natural, respectivamente, y luego cambiando, de manera conocida *per se*, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de tal manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifica para un dominio variable único de inmunoglobulina “humanizado” o “camelizado”, respectivamente. Este ácido nucleico puede expresarse luego de una manera conocida *per se*, para proporcionar los dominios variables únicos de inmunoglobulina deseados. Alternativamente, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} o un dominio V_H que se producen de manera natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos de los dominios variables únicos de inmunoglobulina humanizados o camelizados deseados, respectivamente, pueden diseñarse y luego sintetizarse *de novo* usando técnicas para la síntesis de péptidos conocida *per se*. Además, basándose en la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos de un dominio V_{HH} o un dominio V_H que se producen de manera natural, respectivamente, una secuencia de nucleótidos que codifica para dominios variables únicos de inmunoglobulina humanizados o camelizados deseados, respectivamente, puede diseñarse y luego sintetizarse *de novo* usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocida *per se*, tras lo cual el ácido nucleico obtenido de ese modo puede expresarse de una manera conocida *per se*, para proporcionar los dominios variables únicos de inmunoglobulina deseados.

Generalmente, las proteínas o los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en un solo bloque de construcción, un solo dominio variable único de inmunoglobulina o un solo Nanobody, se denominarán en el presente documento proteínas o polipéptidos “monovalentes” o “constructos monovalentes”, o bloque de construcción monovalente, dominio variable único de inmunoglobulina monovalente o Nanobody monovalente, respectivamente. Las proteínas y los polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en dos o más dominios variables únicos de inmunoglobulina (tal como al menos dos dominios variables únicos de inmunoglobulina) se denominarán en el presente documento proteínas o polipéptidos “multivalentes” o “constructos multivalentes”, y estos proporcionan determinadas ventajas en comparación con los dominios variables únicos de inmunoglobulina monovalentes correspondientes. Algunos ejemplos no limitativos de tales constructos multivalentes resultarán evidentes a partir de la descripción adicional en el presente documento. Los polipéptidos de la invención son “multivalentes”, es decir, comprenden dos o más bloques de construcción o ISV de los cuales al menos el primer bloque de construcción, que es un ISV, tal como un Nanobody, y el segundo bloque de construcción, que es un ISV, tal como un Nanobody, son diferentes, y se dirigen contra diferentes dianas tal como se define por las reivindicaciones, tales como antígenos o determinantes antigénicos. Los polipéptidos de la invención que contienen al menos dos ISV, tales como Nanobodies, en los que al menos un ISV, tal como un Nanobody, se dirige contra un primer antígeno (es decir, contra la primera diana, tal como, por ejemplo, CXCR4) y al menos un ISV, tal como un Nanobody, se dirige contra un segundo antígeno (es decir, contra la segunda diana que es diferente de la primera diana, tal como, por ejemplo, CD123), también se denominarán polipéptidos “multiespecíficos” de la invención, y los bloques de construcción, ISV, tales como Nanobodies, presentes en tales polipéptidos también se denominarán en el presente documento como que están en un “formato multivalente”. Por tanto, por ejemplo, un polipéptido “biespecífico” de la invención es un polipéptido que comprende al menos un ISV, tal como un Nanobody, dirigido contra una primera diana (por ejemplo, CXCR4) y al menos un ISV adicional, tal como un Nanobody, dirigido contra una segunda diana (es decir, dirigido contra una segunda diana diferente de dicha primera diana, por ejemplo, CD123), mientras que un polipéptido “triespecífico” de la invención es un polipéptido que comprende al menos un ISV, tal como un Nanobody, dirigido contra una primera diana (por ejemplo, CXCR4), un segundo ISV, tal como un Nanobody, dirigido contra una segunda diana diferente de dicha primera diana (por ejemplo, CD123) y al menos un bloque de construcción, ISV o Nanobody adicional dirigido contra un tercer antígeno (es decir, diferente de tanto la primera como la segunda diana), tal como, por ejemplo, albúmina sérica; etc. Tal como resultará evidente a partir de la descripción, la invención no se limita a polipéptidos biespecíficos, en el sentido que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender al menos un primer ISV, tal como un Nanobody, contra una primera diana, un segundo ISV, tal como un Nanobody, contra una segunda diana y cualquier número de bloques de construcción, ISV o Nanobodies dirigidos contra una o más dianas, que pueden ser el mismo o diferentes de la primera y/o segunda diana, respectivamente. Los bloques de construcción, ISV o Nanobodies pueden ligarse opcionalmente a través de secuencias de ligador.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un polipéptido triespecífico o multiespecífico, que comprende o consiste esencialmente en al menos tres restos de unión, tales como tres ISV, en el que al menos uno de dichos al menos tres restos de unión es un ISV dirigido contra una primera diana con una baja afinidad, al menos uno de dichos al menos tres restos de unión es un ISV dirigido contra una segunda diana con una alta afinidad y al menos un tercer resto de unión que aumenta la semivida, tal como, por ejemplo, un agente de unión a albúmina.

Tal como resultará evidente a partir de la descripción adicional anterior y en el presente documento, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden usarse como “bloques de construcción” para formar polipéptidos de la invención, por ejemplo, combinándolos de manera adecuada con otros grupos, residuos, restos o unidades de unión, con el fin de formar compuestos o constructos tal como se describe en el presente documento (tal como, sin limitaciones, los polipéptidos bi/tri/tetra/multivalentes y bi/tri/tetra/multiespecíficos de la invención descritos en el presente documento) que combinan dentro de una molécula una o más funciones biológicas o propiedades

deseadas.

Los compuestos o polipéptidos de la invención pueden prepararse generalmente mediante un método que comprende al menos una etapa de ligar de manera adecuada el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina al uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales, opcionalmente a través del uno o más ligadores adecuados, para proporcionar el compuesto o polipéptido de la invención. Los polipéptidos de la invención también pueden prepararse mediante un método que comprende generalmente al menos las etapas de proporcionar un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la invención, que expresa dicho ácido nucleico de manera adecuada, y recuperar el polipéptido expresado de la invención. Tales métodos pueden realizarse de manera adecuada *per se*, que resultará evidente para el experto en la técnica, por ejemplo, basándose en los métodos y las técnicas descritos adicionalmente en el presente documento.

El procedimiento de diseño/selección y/o preparación de un compuesto o polipéptido de la invención, partiendo de una secuencia de aminoácidos, también se denomina en el presente documento "formatear" dicha secuencia de aminoácidos de la invención; y se dice que un aminoácido forma parte de un compuesto o polipéptido de la invención está "formateado" o que está "en el formato de" dicho compuesto o polipéptido de la invención. Los ejemplos de modos en los que una secuencia de aminoácidos puede formatearse y los ejemplos de tales formatos resultarán evidentes para el experto en la técnica basándose en la divulgación en el presente documento; y tales dominios variables únicos de inmunoglobulina formateados forman un aspecto adicional de la divulgación.

Por ejemplo, tales grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales pueden ser uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina adicionales, tales que el compuesto o constructo es una proteína (de fusión) o un polipéptido (de fusión). En un aspecto preferido pero no limitativo, dicho uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión distintos son secuencias de inmunoglobulina. Incluso más preferiblemente, dicho uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión distintos se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un solo dominio, dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISV) que son adecuados para su uso como anticuerpo de un solo dominio, "dAc", dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como dAc, o Nanobodies. Alternativamente, tales grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden ser, por ejemplo, grupos químicos, residuos, restos, que pueden o no ser biológica y/o farmacológicamente activos por sí mismos. Por ejemplo, y sin limitación, tales grupos pueden ligarse al uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina para proporcionar un "derivado" de una secuencia de aminoácidos o polipéptido de la invención, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

También se encuentran dentro del alcance de la presente invención compuestos o constructos, que comprenden o consisten esencialmente en uno o más derivados tal como se describe en el presente documento, y opcionalmente comprenden adicionalmente uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión distintos, opcionalmente ligados a través de uno o más ligadores. Preferiblemente, dicho uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión distintos son dominios variables únicos de inmunoglobulina. En los compuestos o constructos descritos anteriormente, el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina y el uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden ligarse directamente entre sí y/o a través de uno o más ligadores o espaciadores adecuados. Por ejemplo, cuando el uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión son dominios variables únicos de inmunoglobulina, los ligadores también pueden ser dominios variables únicos de inmunoglobulina, de manera que el compuesto o constructo resultante es una proteína de fusión o un polipéptido de fusión.

En un aspecto específico pero no limitativo de la invención, que se describirá adicionalmente en el presente documento, los polipéptidos de la invención tienen una semivida aumentada en suero (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) en comparación con el dominio variable único de inmunoglobulina del cual se han derivado. Por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina puede ligarse (químicamente o de otro modo) a uno o más grupos o restos que prolongan la semivida (tal como PEG), para proporcionar un derivado de una secuencia de aminoácidos con semivida aumentada.

En un aspecto específico de la invención, un compuesto de la invención o un polipéptido de la invención puede tener una semivida aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente de la invención. Algunos ejemplos preferidos pero no limitativos de tales compuestos y polipéptidos resultarán evidentes para el experto en la técnica basándose en la divulgación adicional en el presente documento y, por ejemplo, comprenden dominios variables únicos de inmunoglobulina o polipéptidos de la invención que se han modificado químicamente para aumentar la semivida de los mismos (por ejemplo, por medio de pegilación); dominios variables únicos de inmunoglobulina que comprenden al menos un sitio de unión adicional para la unión a una proteína sérica (tal como albúmina sérica); o polipéptidos de la invención que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos que se liga a al menos un resto (y en particular al menos una secuencia de aminoácidos) que aumenta la semivida de la secuencia de aminoácidos. Los ejemplos de polipéptidos de la invención que comprenden tales restos o dominios variables únicos de inmunoglobulina de extensión de la semivida prolongada resultarán evidentes para el experto en la técnica basándose en la divulgación adicional en el presente documento; y, por ejemplo, incluyen, sin limitación, polipéptidos en los que el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina se ligan de manera adecuada a

una o más proteínas séricas o fragmentos de las mismas (tales como albúmina sérica (humana) o fragmentos adecuados de la misma) o a una o más unidades de unión que pueden unirse a proteínas séricas (tales como, por ejemplo, anticuerpos de dominio, dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como anticuerpo de dominio, anticuerpos de un solo dominio, dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como anticuerpo de un solo dominio, "dAc", dominios variables únicos de inmunoglobulina que son adecuados para su uso como dAc, o Nanobodies que pueden unirse a proteínas séricas tales como albúmina sérica (tales como albúmina sérica humana), inmunoglobulinas séricas tales como IgG, o transferrina; se hace referencia a la descripción adicional y se mencionan referencias en el presente documento); polipéptidos en los que una secuencia de aminoácidos se liga a una porción Fc (tal como un Fc humano) o una parte o un fragmento adecuados de los mismos; o polipéptidos en los que el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina se ligan de manera adecuada a una o más proteínas o péptidos pequeños que pueden unirse a proteínas séricas, tales como, sin limitación, las proteínas y los péptidos descritos en los documentos WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489, WO2008/068280, WO2009/127691 y PCT/EP2011/051559 (WO2011/095545).

Generalmente, los compuestos o polipéptidos de la invención con semivida aumentada tienen preferiblemente una semivida que es al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la semivida de la secuencia de aminoácidos correspondiente *per se*. Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de la invención con semivida aumentada pueden tener una semivida, por ejemplo, en humanos, que se aumenta en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 ó 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente *per se*.

En un aspecto preferido pero no limitativo de la invención, tales compuestos o polipéptidos de la invención tienen una semivida en suero, por ejemplo, en humanos, que se aumenta en más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 ó 72 horas, en comparación con la secuencia de aminoácidos correspondiente *per se*.

En otro aspecto preferido pero no limitativo de la invención, tales compuestos o polipéptidos de la invención muestran una semivida en suero en humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferiblemente al menos 24 horas, más preferiblemente al menos 48 horas, incluso más preferiblemente al menos 72 horas o más. Por ejemplo, los compuestos o polipéptidos de la invención pueden tener una semivida de al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), preferiblemente al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o al menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente al menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

En un aspecto particularmente preferido pero no limitativo de la invención, la invención proporciona un polipéptido de la invención que comprende unos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISV) primero y segundo, en el que dicho primer ISV se une a una primera diana en la superficie de una célula con una baja afinidad y cuando se une inhibe una función de dicha primera diana; y dicho segundo ISV se une a una segunda diana en la superficie de dicha célula con una alta afinidad, y preferiblemente inhibe una función de dicha segunda diana mínimamente, en el que dicha primera diana es diferente de dicha segunda diana; y que comprende además uno o más (preferiblemente uno) dominios variables únicos de inmunoglobulina de unión a albúmina sérica tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina de unión a albúmina sérica de SEQ ID NO: 114 ó 115 (tabla B-4).

Conjugados polipéptido-fármaco (PDC)

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención se conjugan con fármacos para formar conjugados polipéptido-fármaco (PDC). Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) contemporáneos se usan en aplicaciones de oncología, en las que el uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de fármacos, tales como agentes citotóxicos o citostáticos, toxinas o restos de toxina, permite la administración dirigida del resto de fármaco a tumores, que pueden permitir una mayor eficacia, menor toxicidad, etc. Estos ADC tienen tres componentes: (1) un anticuerpo monoclonal conjugado a través de un (2) ligador con (3) toxina o resto de toxina. Una visión general de esta tecnología se proporciona en Ducry *et al.*, Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010), Carter *et al.*, Cancer J. 14(3):154 (2008) y Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009). Los PDC también tienen tres componentes: (1) un polipéptido conjugado a través de un (2) eligador con un (3) fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina. El experto en la técnica apreciará que la tecnología, los métodos, los medios, etc. de ADC son igualmente aplicables a los PDC.

La invención proporciona polipéptidos de la invención que comprenden un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina.

El fármaco, por ejemplo, toxina o resto de toxina, puede ligarse o conjugarse con el polipéptido usando cualquier

método adecuado. Generalmente, la conjugación se lleva a cabo mediante unión covalente al polipéptido, tal como se conoce en la técnica, y generalmente se basa en un ligador, a menudo una ligación peptídica. Por ejemplo, el fármaco, tal como toxina o resto de toxina, puede unirse de manera covalente al polipéptido directamente o a través de un ligador adecuado. Los ligadores adecuados pueden incluir ligadores escindibles o no escindibles, por ejemplo, ligadores escindibles por pH que comprenden un sitio de escisión para una enzima celular (por ejemplo, esterasas celulares, proteasas celulares tales como catepsina B). Tales ligadores escindibles pueden usarse para preparar un ligando que puede liberar un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina después de que se internalice el polipéptido. Tal como se apreciará por aquellos en la técnica, el número de restos de fármaco por polipéptido puede cambiar, dependiendo de las condiciones de la reacción, y puede variar desde 1:1 hasta 10:1 de fármaco:polipéptido. Tal como también se apreciará por aquellos en la técnica, el número real es un promedio. Puede usarse una variedad de métodos para ligar o conjugarse un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina, con un polipéptido. El método particular seleccionado dependerá del fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina, y del polipéptido que va a ligarse o conjugarse. Si se desea, pueden usarse ligadores que contienen grupos funcionales terminales para ligar el polipéptido y el fármaco, por ejemplo, una toxina o un resto de toxina. Generalmente, la conjugación se logra haciendo reaccionar el fármaco, por ejemplo, una toxina o un resto de toxina que contiene un grupo funcional reactivo (o se modifica para contener un grupo funcional reactivo), con un ligador o directamente con un polipéptido. Los enlaces covalentes se forman haciendo reaccionar un fármaco, por ejemplo, una toxina o un resto de toxina que contiene (o se modifica para contener) un resto químico o grupo funcional, que puede hacerse reaccionar, en condiciones apropiadas, con un segundo grupo químico formando de ese modo un enlace covalente. Si se desea, puede añadirse un grupo químico reactivo adecuado al polipéptido o a un ligador usando cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Se conocen muchas combinaciones de grupos químicos reactivos adecuados en la técnica, por ejemplo, un grupo amina que puede hacerse reaccionar con un grupo electrófilo tal como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, fluoro, yodo), éster N-hidroxisuccinimidílico (NHS), y similares. Los tioles pueden hacerse reaccionar con disulfuros de piridilo, acrilóilo, yodoacetilo, maleimida, tiol del ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol), y similares. Puede acoplarse un grupo funcional aldehído a moléculas que contienen amina o hidrazida, y puede hacerse reaccionar un grupo azida con un grupo de fósforo trivalente para formar uniones fosforamido o fosforimida. Los métodos adecuados para introducir grupos de activación en moléculas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)).

Tal como se describe a continuación, el fármaco del PDC puede ser cualquier número de agentes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes citostáticos, agentes citotóxicos tales como agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), restos de toxina, o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado) se proporcionan. En otras realizaciones, la divulgación proporciona además métodos de uso de los PDC.

Los fármacos para su uso en la presente invención incluyen fármacos citotóxicos, particularmente aquellos que se usan para terapia contra el cáncer. Tales fármacos incluyen, en general, agentes que dañan el ADN, antimetabolitos, productos naturales y sus análogos. Las clases de agentes citotóxicos a modo de ejemplo incluyen los inhibidores de enzimas tales como inhibidores de la dihidrofolato reductasa, e inhibidores de la timidilato sintasa, intercaladores de ADN, escindidores de ADN, inhibidores de la topoisomerasa, la familia de fármacos antraciclina, los fármacos de la vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos pteridina, diinenos, las podofilotoxinas, dolastatinas, maitansinoides, inductores de la diferenciación y taxoles.

Los miembros de estas clases incluyen, por ejemplo, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptapurina, arabinósido de citosina, melfalano, leurosina, leurosideína, actinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, caminomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina y derivados de podofilotoxina tales como etopósido o fosfato de etopósido, vinblastina, vincristina, vindesina, taxanos incluyendo taxol, Taxotere, ácido retinoico, ácido butírico, N8-acetilespermidina, camptotecina, caliqueamicina, esperamicina, eno-diinos, duocarmicina A, duocarmicina SA, caliqueamicina, camptotecina, maitansinoides (incluyendo DM1), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), y maitansinoides (DM4) y sus análogos.

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

Se contemplan los conjugados de un polipéptido de la invención y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno, caliqueamicina y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Otros fármacos, tales como agentes antitumorales, que pueden conjugarse con los polipéptidos de la invención

incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 en las patentes estadounidenses n.ºs 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente estadounidense n.º 5.877.296).

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

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

Para la destrucción selectiva del tumor, el polipéptido de la invención puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radiactivos de Lu.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácido adecuados que implica, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como Tc99m o I123, Re186, Re188 e In111 pueden unirse a través de un residuo de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

La generación de compuestos de conjugado polipéptido-fármaco puede lograrse mediante cualquier técnica conocida para el experto en la técnica en el campo de ADC. En resumen, los compuestos de conjugado polipéptido-fármaco pueden incluir polipéptido de la invención como la unidad de anticuerpo, un fármaco y opcionalmente un ligador que se une al fármaco y al agente de unión.

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

Por consiguiente, la invención se refiere a un polipéptido de la invención que comprende además un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido según la invención conjugado a un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina.

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

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido según la invención, que comprende además un agente de obtención de imágenes incluyendo, pero sin limitarse a, una molécula seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos de metal, metales, oro coloidal, marcador fluorescente, marcador metálico, biotina, agente quimioluminiscente, agente bioluminiscente, cromóforo y mezclas de los mismos.

Ligadores

En los polipéptidos de la invención, los dos o más bloques de construcción, ISV o Nanobodies y el opcionalmente uno o más polipéptidos, uno o más grupos, fármacos, agentes, residuos, restos o unidades de unión distintos pueden ligarse directamente entre sí (tal como se describe, por ejemplo, el documento WO 99/23221) y/o pueden ligarse entre sí a través de uno o más espaciadores o ligadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos. Los espaciadores o ligadores adecuados para su uso en polipéptidos multivalentes y multiespecíficos resultarán evidentes para el experto en la técnica, y pueden ser generalmente cualquier ligador o espaciador usado en la técnica para ligar secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, dicho ligador o espaciador es adecuado para su uso en la construcción de proteínas o polipéptidos que están destinados para su uso farmacéutico. II

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

Por ejemplo, un ligador puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada, y en particular secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferiblemente entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos de aminoácido. Algunos ejemplos preferidos de tales secuencias de aminoácidos incluyen ligadores Gly-Ser, por ejemplo del tipo $(Gly_xSer_y)_z$, tal como (por ejemplo $(Gly_4Ser)_3$ o $(Gly_3Ser_2)_3$, tal como se describe en el documento WO 99/42077 y los ligadores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las solicitudes de Ablynx mencionadas en el presente documento (véanse, por ejemplo, los documentos WO 06/040153 y WO 06/122825), así como regiones similares a una región bisagra, tales como las regiones bisagra de anticuerpos de cadena pesada que se producen de manera natural o secuencias similares (tal como se describe en el documento WO 94/04678). Los ligadores preferidos se representan en la tabla B-5.

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

Otros ligadores adecuados comprenden generalmente polímeros o compuestos orgánicos, en particular aquellos adecuados para su uso en proteínas para uso farmacéutico. Por ejemplo, se han usado restos poli(etilenglicol) para ligar dominios de anticuerpo, véase por ejemplo el documento WO 04/081026.

Se abarca dentro del alcance de la invención que la longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del/de los ligador(es) usado(s) (aunque no críticos, como es normalmente para los ligadores usados en fragmentos ScFv) pueden tener alguna influencia sobre las propiedades del polipéptido final de la invención incluyendo, pero sin limitarse a, la afinidad, especificidad o avidez para una quimiocina, o para uno o más de los otros antígenos. Basándose en la divulgación en el presente documento, el experto en la técnica será capaz de determinar el/los ligador(es) óptimo(s) para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Por ejemplo, en polipéptidos multivalentes de la invención que comprenden bloques de construcción, ISV o Nanobodies dirigidos contra una primera y una segunda diana, la longitud y flexibilidad del ligador son preferiblemente tal que permiten que cada bloque de construcción, ISV o Nanobody presente en el polipéptido se una a su diana relacionada, por ejemplo, el determinante antigénico en cada una de las dianas. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto en la técnica será capaz de determinar el/los ligador(es) óptimo(s) para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

También se encuentra dentro del alcance de la invención que el/los ligador(es) usado(s) confiere(n) una o más de otras propiedades favorables o funcionalidad distintas a los polipéptidos de la invención, y/o proporciona(n) uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la unión de grupos funcionales (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento para los derivados de los Nanobodies). Por ejemplo, los ligadores que contienen uno o más residuos de aminoácido cargados pueden proporcionar propiedades hidrófilas mejoradas, mientras que los ligadores que forman o contienen pequeños epítomos o etiquetas pueden usarse con fines de detección, identificación y/o purificación. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto en la técnica será capaz de determinar los ligadores óptimos para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Finalmente, cuando dos o más ligadores se usan en los polipéptidos de la invención, estos ligadores pueden ser el mismo o diferentes. De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento, el experto en la técnica será

capaz de determinar los ligadores óptimos para su uso en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Normalmente, para facilitar la expresión y producción, un polipéptido de la invención será un polipéptido lineal. Sin embargo, la invención en su sentido más amplio no se limita al mismo. Por ejemplo, cuando un polipéptido de la invención comprende tres o más bloques de construcción, ISV o Nanobodies, es posible ligarlos mediante el uso de un ligador con tres o más "brazos", cada "brazo" que se liga a un bloque de construcción, ISV o Nanobody, para proporcionar un constructo "con forma de estrella". También es posible, aunque normalmente menos preferido, usar constructos circulares.

Composiciones terapéuticas y de diagnóstico y usos

La invención proporciona composiciones que comprenden los polipéptidos de la invención, incluyendo PDC de la invención, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. También se divulgan métodos terapéuticos y de diagnóstico que emplean los polipéptidos o las composiciones de la invención. Los polipéptidos, incluyendo PDC, según el método de la presente divulgación, pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vivo* y similares. Los usos terapéuticos y profilácticos de los polipéptidos, incluyendo PDC, de la divulgación implican la administración de polipéptidos, incluyendo PDC, según la invención a un mamífero receptor, tal como un humano.

Se prefieren polipéptidos y PDC sustancialmente puros de al menos una homogeneidad del 90 al 95% para su administración a un mamífero, y lo más preferido una homogeneidad del 98 al 99% o más para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad tal como se desee, los polipéptidos y PDC pueden usarse de manera terapéutica o de diagnóstico (incluyendo de manera extracorpórea) o en el desarrollo y la realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) *Immunological Methods*, volúmenes I y II, Academic Press, NY).

Por ejemplo, los polipéptidos y PDC de la presente invención encontrarán uso normalmente en la prevención, la supresión o el tratamiento de estados patológicos. Por ejemplo, los polipéptidos o PDC pueden administrarse para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o viral, trastornos autoinmunitarios (que incluyen, pero no se limitan a, diabetes tipo I, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, espondiloartropatía (por ejemplo, espondilitis anquilosante), lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), miastenia grave y síndrome de Behcet, psoriasis, endometriosis y adhesiones abdominales (por ejemplo, después de cirugía abdominal). Los polipéptidos y PDC son útiles para tratar enfermedades infecciosas en las que las células infectadas con un agente infeccioso contienen mayores niveles de EGFR de la superficie celular que células sin infectar o que contienen una o más dianas de la superficie celular que no están presentes en células no infectadas, tales como una proteína que se codifica por el agente infeccioso (por ejemplo, bacterias, virus). Los polipéptidos y PDC de la presente invención encontrarán uso normalmente en la prevención, la supresión o el tratamiento de un cáncer. Por ejemplo, los polipéptidos y PDC pueden administrarse para tratar, suprimir o prevenir cáncer, que incluyen, pero no se limitan a, carcinomas, gliomas, mesoteliomas, melanomas, linfomas, leucemias, adenocarcinomas: cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, mieloma múltiple (incluyendo gammapatía monoclonal de significancia indeterminada, mieloma asintomático y sintomático), cáncer de próstata y linfoma de Burkitt, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer hepatobiliar, cáncer de vesícula biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pene, cáncer de uretra, cáncer de testículo, cáncer de vagina, cáncer de útero, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de glándulas suprarrenales, cáncer endocrino de páncreas, cáncer carcinoide, cáncer de hueso, cáncer de piel, retinoblastomas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica o linfoma de efusión primaria asociado con SIDA, tumores neuroectodérmicos, rabdomiosarcoma (véase, por ejemplo, *Cancer, Principles and practice* (DeVita, V.T. *et al.* eds 1997) para cánceres adicionales); así como cualquier metástasis de cualquiera de los cánceres anteriores, así como indicaciones no cancerosas tales como poliposis nasal; así como otros trastornos y enfermedades descritos en el presente documento.

En la presente solicitud, el término "prevención" implica la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. "Supresión" se refiere a una administración de la composición después de un evento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de manifestarse los síntomas de la enfermedad. El tratamiento incluye la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad, y también la prevención o el retraso de la aparición de la enfermedad y también la disminución de la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad.

Se encuentran disponibles sistemas de modelo de animal que pueden usarse para evaluar la eficacia de los polipéptidos y PDC de la invención en la prevención, el tratamiento o la supresión de la enfermedad (por ejemplo,

cáncer). Los modelos de cáncer adecuados incluyen, por ejemplo, modelos de xenoinjerto y ortotópicos de cánceres humanos en modelos de animal, tales como el modelo de mieloma de SCID-hu (Epstein J, y Yaccoby, S., *Methods Mol Med.* 773:183-90 (2005), Tassone P, *et al*, *Clin Cancer Res.* 11:4251-8 (2005)), modelos de ratón de cáncer de pulmón humano (por ejemplo, Meuwissen R y Berns A, *Genes Dev.* CHECK: 643-64 (2005)) y modelos de ratón de cánceres metastásicos (por ejemplo, Kubota J *Cell Biochem.* 56:4-8 (1994)).

Generalmente, los presentes polipéptidos y PDC se utilizarán en forma purificada junto con portadores farmacológicamente apropiados. Normalmente, estos portadores incluyen disoluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y/o medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y Ringer lactado. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios, para mantener un complejo de polipéptido o PDC en suspensión, pueden elegirse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y regeneradores de nutrientes y regeneradores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición). Puede usarse una variedad de formulaciones adecuadas, incluyendo formulaciones de liberación prolongada.

Los polipéptidos y PDC de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Los polipéptidos y PDC pueden administrarse y/o formularse junto con uno o más agentes terapéuticos o activos adicionales. Cuando se administra un polipéptido o PDC con un agente terapéutico adicional, el polipéptido o PDC puede administrarse antes, simultáneamente con o posterior a la administración del agente adicional. Generalmente, el polipéptido o PDC y el agente adicional se administran de una manera que proporciona un solapamiento de efecto terapéutico.

Los polipéptidos y PDC de la invención pueden administrarse conjuntamente (por ejemplo, para tratar cáncer, una enfermedad inflamatoria u otra enfermedad) con una variedad de agentes coterapéuticos adecuados, incluyendo citocinas, analgésicos/antitérmicos, antieméticos y quimioterápicos.

Por tanto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o PDC de la invención y un agente quimioterápico, en el que el agente quimioterápico se administra a una dosis baja. Generalmente, la cantidad de agente quimioterápico que se administra conjuntamente con un polipéptido de la invención es de aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 70%, o aproximadamente el 60%, o aproximadamente el 50%, o aproximadamente el 40%, o aproximadamente el 30%, o aproximadamente el 20%, o aproximadamente el 10% o menos, de la dosis de agente quimioterápico solo que se administra normalmente a un paciente. Por tanto, la terapia conjunta es particularmente ventajosa cuando el agente quimioterápico provoca efectos secundarios perjudiciales o no deseados que pueden reducirse o eliminarse a dosis más bajas.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos agentes citotóxicos u otros junto con los polipéptidos o PDC de la presente invención, o incluso combinaciones de polipéptidos y PDC según la presente invención que tienen especificidades diferentes, tales como polipéptidos o PDC seleccionado usando antígenos o epítopos de diana diferentes, se agrupen o no antes de la administración.

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas según la invención puede ser cualquier vía adecuada, tal como cualquiera de aquellas conocidas comúnmente por los expertos habituales en la técnica. Para la terapia, incluyendo, sin limitación, inmunoterapia, los polipéptidos y PDC de la invención pueden administrarse a cualquier paciente según técnicas convencionales. La administración puede ser mediante cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intratecal, intraarticular, a través de la vía pulmonar, o también, de manera apropiada, mediante infusión directa (por ejemplo, con un catéter). La dosificación y frecuencia de administración dependerá de la edad, el sexo y el estado del paciente, la administración simultánea de otros fármacos, las contraindicaciones y otros parámetros que el médico debe tener en cuenta. La administración puede ser local (por ejemplo, administración local al pulmón mediante administración pulmonar (por ejemplo, administración intranasal) o inyección local directamente en un tumor) o sistémica según se indique.

Los polipéptidos y PDC de esta invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un portador adecuado antes de su uso. Esta técnica ha demostrado ser eficaz con inmunoglobulinas convencionales y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Se apreciará por los expertos en la técnica que la liofilización y reconstitución pueden conducir a diversos grados de pérdida de actividad de anticuerpo (por ejemplo, con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una pérdida de actividad mayor que los anticuerpos IgG) y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse hacia arriba para compensar.

Las composiciones que contienen los polipéptidos o PDC pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En determinadas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para lograr al menos la inhibición, supresión, modulación, destrucción parcial, o algún otro parámetro medible, de una población de células seleccionada se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para lograr esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general de la salud del paciente, pero generalmente oscilan desde 0,005 hasta 5,0 mg de ligando por kilogramo de peso corporal, siendo las dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis las usadas más comúnmente. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes polipéptidos y PDC o cócteles de los mismos también pueden administrarse en dosificaciones similares o ligeramente menores, para prevenir, inhibir o retrasar la aparición de la enfermedad (por ejemplo, para mantener la remisión o quiescencia, o para prevenir la fase aguda). El médico experto será capaz de determinar el intervalo de dosificación apropiado para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad. Cuando se administran polipéptidos o PDC para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad, pueden administrarse hasta cuatro veces al día, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses, a una dosis de, por ejemplo, de aproximadamente 10 [mu]g/kg a aproximadamente 80 mg/kg, de aproximadamente 100 [mu]g/kg a aproximadamente 80 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 10 [mu]g/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 10 [mu]g/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 10 [mu]g/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg.

En realizaciones particulares, el polipéptido y PDC de la invención se administra a una dosis que proporciona saturación de la diana de anclaje o una concentración en suero deseada *in vivo*. El médico experto puede determinar la administración de dosis apropiada para lograr la saturación, por ejemplo, titulando el polipéptido y monitorizando la cantidad de sitios de unión libres de dicha diana de anclaje que expresa células o la concentración en suero del polipéptido. Los regímenes terapéuticos que implican administrar un agente terapéutico para lograr la saturación de la diana o una concentración en suero de agente deseada son comunes en la técnica, particularmente en el campo de oncología.

El tratamiento o la terapia realizados usando las composiciones descritas en el presente documento se considera "eficaz" si se reducen uno o más síntomas (por ejemplo, en al menos el 10% o al menos un punto en una escala de evaluación clínica), con respecto a tales síntomas presentes antes del tratamiento, o con respecto a tales síntomas en un individuo (humano o animal modelo) no tratados con tal composición u otro control adecuado. De manera obvia, los síntomas variarán dependiendo de la enfermedad o el trastorno seleccionado como diana, pero pueden medirse por un médico o técnico experto habitual en la técnica. Tales síntomas pueden medirse, por ejemplo, monitorizando el nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o el trastorno (por ejemplo, niveles de una enzima o un metabolito correlacionados con la enfermedad, números de células afectadas, etc.), monitorizando manifestaciones físicas (por ejemplo, inflamación, tamaño de tumor, etc.) o mediante una escala de evaluación clínica aceptada. Una reducción sostenida (por ejemplo, un día o más, preferiblemente más prolongada) en los síntomas de la enfermedad o el trastorno en al menos el 10% o en uno o más puntos en una escala clínica dada es indicativa de tratamiento "eficaz". De manera similar, la profilaxis realizada usando una composición tal como se describe en el presente documento es "eficaz" si la aparición o gravedad de uno o más síntomas se retrasa, reduce o elimina con respecto a tales síntomas en un individuo similar (humano o modelo animal) no tratado con la composición.

Una composición que contiene polipéptidos y/o PDC según la presente invención puede utilizarse en entornos profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, los ligandos y repertorios de polipéptidos seleccionados descritos en el presente documento pueden usarse de manera extracorpórea o de manera selectiva *in vitro* para destruir, agotar o eliminar eficazmente de cualquier otro modo una población de células diana de una colección heterogénea de células. La sangre de un mamífero puede combinarse de manera extracorpórea con los ligandos, por ejemplo, anticuerpos, receptores de la superficie celular o proteínas de unión de los mismos, por lo que las células no deseadas se destruyen o eliminan de otro modo de la sangre para regresar al mamífero según técnicas convencionales.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o PDC según la invención.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para administrar un polipéptido, PDC o agente de obtención de imágenes profiláctico o terapéutico a una ubicación, un tejido o un tipo de célula específicos en el cuerpo, comprendiendo el método las etapas de administrar a un sujeto un polipéptido según la invención.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un sujeto que lo necesita que comprende administrar un polipéptido o PDC según la invención.

- 5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido o PDC según la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesita.

Las realizaciones ilustradas y comentadas en esta memoria descriptiva están destinadas sólo a enseñar a los expertos en la técnica el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo y usar la invención.

- 10 Ahora, la invención se describirá adicionalmente por medio de los siguientes aspectos, ejemplos y figuras preferidos no limitativos.

Sección experimental

- 15 Ejemplo 1: Direccionamiento preferencial de células leucémicas con polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD123

Ejemplo 1.1: Configuración experimental para el diseño de polipéptidos biespecíficos CXCR4 y CD123

- 20 Con la generación de Nanobodies biespecíficos anti-CXCR4-CD123 se pretendió generar un antagonista de alta afinidad y alta potencia para CXCR4 en células que expresan los receptores tanto de CXCR4 como de CD123, como un sistema modelo para células cancerosas, pero no en células que expresan principalmente CXCR4, que representan células normales, todo con el fin de minimizar los efectos secundarios o la toxicidad.

- 25 Para lograr esta selectividad, se planteó la hipótesis de que el Nanobody anti-CXCR4 en un brazo (el ISV funcional) necesita ser un antagonista completo, pero con sólo una afinidad de baja a moderada. El Nanobody anti-CD123 en el otro brazo (el ISV de anclaje) sirve para aumentar la afinidad y la potencia del Nanobody anti-CXCR4 en células que expresan conjuntamente ambos receptores por avidéz. La unión simultánea a 2 receptores de membrana aumentará la afinidad de los Nanobodies biespecíficos con respecto a los monovalentes. Para el brazo CD123, el Nanobody es preferentemente un agente de unión, pero que no afecta a su función, de nuevo con el fin de minimizar los efectos secundarios o la toxicidad. Así, no se requiere un bloqueo funcional del receptor de CD123. Se usó el sistema modelo tal como se muestra en la figura 1.1 para investigar la función selectiva de constructos biespecíficos CD123-CXCR4, que se unen con alta avidéz a células que expresan ambos receptores (es decir, células madre leucémicas), pero que sólo tienen una baja afinidad y potencia para células CXCR4+/CD123- (es decir, células madre hematopoyéticas normales).

- La afinidad de cada uno de los Nanobodies necesaria para obtener la avidéz aumentada es desconocida *a priori*; cuando la afinidad es demasiado alta, el biespecífico también se unirá a células que expresan sólo un receptor, que no es lo deseado. Para ello se propuso diseñar procedimientos de selección para Nanobodies con diferentes afinidades para IL3R α para combinarse con Nanobodies CXCR4 de potencia de baja a moderada.

Ejemplo 1.2: Producción de Nanobodies monovalentes

- 45 Se produjeron Nanobodies monovalentes específicos de CXCR4 y CD123 en *E. coli* y se expresaron como proteínas etiquetadas con His6, FLAG3 ligadas en el extremo C-terminal, en el vector de expresión pAX129. Las secuencias de aminoácidos se representan en las tablas 1 y 2 para bloques de construcción monovalentes CXCR4 y bloques de construcción monovalentes CD123, respectivamente. La expresión se indujo mediante IPTG y se dejó que continuara durante 4 h a 37°C. Tras centrifugar los cultivos celulares, se prepararon extractos periplasmáticos congelando-descongelando los sedimentos. Los Nanobodies se purificaron de estos extractos usando cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) y un intercambio de tampón a D-PBS. La pureza y la integridad se confirmaron mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 1.3: Características de Nanobodies específicos anti-CD123

- 55 Con el fin de minimizar los posibles efectos secundarios y/o la toxicidad, los Nanobodies anti-CD123 no afectan preferiblemente a la función del IL3R α , que también se expresa en células normales. Además, con el fin de evitar cualquier complicación mediante la posible introducción de diversidad de epítomos, y para garantizar que cualquier ganancia de función/selectividad en el estudio de prueba de concepto (PoC) se define sólo por la afinidad relativa (es decir, la afinidad del bloque de construcción monovalente), se propuso identificar los Nanobodies que se unen al mismo epítipo pero que sólo difieren en la afinidad relativa.

Ejemplo 1.3.1. Unión de Nanobodies anti-CD123 a células que expresan IL-3R α

- 65 Se analizó la unión del Nanobody a IL-3R α humano asociado a membrana en células HEK293T transfectadas con pcDNA3.1-IL3R α (NM_002183.2) y células no transfectadas. La expresión superficial se confirmó mediante FACS

usando anticuerpos específicos de IL-3R α (R&D MAB301 y BD Pharminogen 554528), seguido por anti-PE de ratón de cabra (Jackson Immuno Research 115-115-164). En resumen, se permitió asociar diluciones en serie de Nanobodies durante 30 minutos a 4°C en tampón de FACS (PBS 1X + FBS al 10% + azida al 0,05%). Tras esto, se lavaron las células mediante centrifugación y se sondearon con anti-FLAG 6,7 nM durante 30 minutos a 4°C, para detectar Nanobody unido. La detección se realizó con anti-M13 durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron las células y se incubaron con TOPRO3 para teñir las células muertas, que se retiraron luego durante el procedimiento de activación. Luego se analizaron las células a través de un BD FACSArray. Los resultados se representan en la figura 1.2.

Se demuestra una clara interacción de los Nanobodies CD123 55A01 y 57A07 con las células Hek-IL-3R α , mientras que la falta de unión a células HEK293T-wt confirmó la especificidad de los Nanobodies para IL-3R α (datos no mostrados).

La unión de los Nanobodies CD123 también se evaluó en células leucémicas que expresan de manera endógena la cadena tanto de IL-3R α como de IL-3R β , es decir células Molm-13 y THP-1. Estas células tienen un nivel de expresión de IL-3R α mucho menor que las células HEK-IL-3Ra transfectadas, y probablemente con más niveles de expresión representativos del receptor. Debido a la menor potencia de los clones seleccionados para este proyecto, las curvas de unión estaban incompletas con respecto a la saturación de unión. Las curvas de unión y los valores de CE50 se muestran en la figura 1.2 y la tabla 3, respectivamente.

Los estudios de unión confirmaron que los Nanobodies son capaces de unirse a IL3R α pero no alteran el complejo de receptor heterodimérico de IL3R α con la pareja IL3R β , que cumple un requisito previo de evasión de un bloqueo funcional de la señalización del receptor de CD123.

Ejemplo 1.3.2. Determinación de afinidad de Nanobodies CD123

Las afinidades de Nanobodies específicos de CD123 se investigaron adicionalmente a través de resonancia de plasmón superficial (SPR) en ProteOn. La inmovilización del ectodominio de IL-3R α recombinante (Sino Biologicals) se realizó hasta 761 RU. Los Nanobodies se aplicaron a una concentración más alta de 1 μ M, seguido por una triple titulación, que abarca 5 concentraciones adicionales que oscilaban desde 1 μ M hasta 4,1 nM. Luego se aplicaron estas en un único ciclo de inyección, utilizando el enfoque cinético de un solo disparo específico de ProteOn para el análisis cinético. La evaluación de los datos de asociación/disociación se realizó ajustando un modelo de interacción 1:1 (modelo de unión de Langmuir). Varios de los clones no pudieron mostrar saturación en la concentración de 1 μ M, debido a la baja afinidad de los Nanobodies. Para los Nanobodies CD123, los valores de K_D obtenidos se correlacionaron bien con las afinidades aparentes recuperadas por los valores de CE50 de unión celular (véase la tabla 3).

Ejemplo 1.3.3. Competición de Nanobodies anti-CD123 con el anticuerpo anti-CD123 7G3

El receptor funcional de IL-3 humana de alta afinidad es un heterodímero que consiste en una subunidad α de unión a ligando y la subunidad β . La subunidad β no se une al ligando de IL-3 por sí misma, pero se requiere para la unión de alta afinidad de IL-3 al complejo de receptor heterodimérico.

El desplazamiento de ligando en células Molm-13 no pudo evaluarse, ya que el ligando biotinilado ejercía una unión demasiado baja. Dado que la IL-3 sólo tiene una baja afinidad para IL-3R α en ausencia del IL-3R β , tampoco pudieron usarse células Hek-IL-3R α transfectadas. Para evaluar la información del epítipo, se analizaron Nanobodies CD123 en competición con el AcM específico de IL-3R α 7G3 para determinar la unión al ectodominio de IL-3R α en ELISA. Se demostró anteriormente que la versión humanizada de anticuerpo monoclonal específico de anti-IL-3R α 7G3, CSL-360, carecía de eficacia funcional en un ensayo clínico en fase I.

En resumen, se recubrió el anticuerpo 7G3 (BD, 554527) en 1 μ g/ml y se bloqueó en caseína (1%) en disolución. Se añadieron Nanobodies y ectodominio de IL-3R α biotinilado [R&D Systems, 301-R3/CF] y se dejó que alcanzaran el equilibrio a lo largo de cuatro horas. Luego se lavó la placa y se detectó IL-3R α asociado a 7G3 a través de extravidina peroxidasa antes del desarrollo y posterior análisis de absorción a D.O._{450 nm}. Los valores de CI50 se muestran en la tabla 3.

Los Nanobodies CD123 se sometieron a prueba para determinar su capacidad para competir con el anticuerpo 7G3. Dos Nanobodies anti-CD123, es decir 55A01 y 57A07, se unieron al mismo epítipo que 7G3, pero tuvieron diferentes afinidades relativas y potencias (véase también la tabla 5). Posteriormente, se usaron estos Nanobodies para el formateo para dar polipéptidos biespecíficos con Nanobodies anti-CXCR4 (véase el ejemplo 1.5)

Ejemplo 1.4: Características de Nanobodies específicos anti-CXCR4

En el presente ejemplo, los inventores se propusieron identificar y caracterizar Nanobodies anti-CXCR4 que, por un

lado, tuvieran una baja afinidad y, por otro lado, aún fueran capaces de actuar como antagonistas funcionales. Dado que es complicado someter a prueba funcionalmente Nanobodies, que tienen una afinidad de baja a moderada, en particular la ausencia de cualquier función observada debe deberse a la baja afinidad, pero no a la unión a, por ejemplo, un epítipo irrelevante, los inventores usaron un enfoque no convencional que se detalla a continuación.

En primer lugar, se evaluó una gran serie de Nanobodies anti-CXCR4 disponibles para determinar su capacidad para antagonizar la señalización de CXCR4. En estudios previos, ya se identificaron Nanobodies antagonistas funcionales específicos para CXCR4. Los presentes inventores recurrieron entonces a miembros de la familia de los antagonistas funcionales, que tuvieron afinidades menores.

Además, los inventores observaron que, en algunos casos, la posición de un Nanobody en un polipéptido biespecífico podía disminuir la afinidad. Sin limitarse a ninguna teoría, se planteó la hipótesis de que esto puede deberse al impedimento estérico. Así, al colocar un Nanobody que se sabe que tiene una afinidad moderada y que tiene actividades antagonistas, en una ubicación “no favorable” en el polipéptido biespecífico, pudieron disminuirse tanto la afinidad como el efecto funcional. Como tal, pudo discernirse el efecto de aidez del segundo Nanobody sobre la función del Nanobody anti-CXCR4 de baja afinidad.

Ejemplo 1.4.1. Identificación de Nanobodies CXCR4 de baja afinidad

Para la generación de CXCR4-IL-3Ra biespecíficos, se necesitan Nanobodies con afinidades de baja a moderada, que reconozcan el epítipo correcto para el bloqueo funcional. En estudios previos, se identificaron Nanobodies antagonistas funcionales específicos para CXCR4. Sin embargo, el objetivo principal durante la selección de indicios y el procedimiento de identificación en aquellos estudios previos era identificar candidatos de alta potencia, y no los clones de baja afinidad. Como la cascada de detección de estudios previos se centraba en el bloqueo de la unión a ligando, esto dificultó la identificación de clones que tienen el epítipo correcto pero bajas potencias debido a la baja afinidad tal como se requiere en el presente estudio. En el caso de CXCR4, que va a incrustarse en la membrana celular para una conformación correcta, no había disponible ninguna fuente de proteína recombinante para buscar específicamente los Nanobodies de baja afinidad mediante análisis de la velocidad de disociación en SPR, tal como se realizó para los Nanobodies IL-3Ra.

Para resolver este problema, los inventores se enfocaron en los miembros de la familia de Nanobodies CXCR4 con bloqueo funcional de ligando probado de la señalización de CXCR4. Los Nanobodies 14A02, 14E02 y 14D09 son miembros de la misma familia, tal como se define por la región de CDR3 conservada. El miembro de la familia de alta afinidad, Nanobody CXCR4 14A02, ha demostrado ser un potente antagonista de la funcionalidad de CXCR4 en diferentes ensayos celulares, incluyendo quimiotaxia inducida por ligando e inhibición de la inducción cAMP en células que expresan CXCR4 (tabla 4).

Ejemplo 1.4.2. Análisis de unión de Nanobodies CXCR4

La unión de Nanobodies CXCR4 a células que expresan CXCR4 se evaluó en diferentes líneas celulares, para evaluar los valores de CE50. Para CXCR4, es necesaria la inserción de membrana para una conformación y una funcionalidad apropiadas del receptor. Por tanto, se caracterizaron los Nanobodies CXCR4 para su unión a lipopartículas virales (VLP; Molecular Integral) que expresan CXCR4 frente a lipopartículas de control en ELISA. Para este fin, se recubrieron las VLP a 0,5 U/pocillo durante la noche a 4°C usando anticuerpos anti-myc para la detección. Sobre todos los diferentes ensayos de unión, el Nanobody 14D09 siempre ejercía una afinidad de unión menor que 14A02, tal como se indica por un cambio en los valores de CE50. Los resultados se representan en la figura 1.3.

Ejemplo 1.4.3. Desplazamiento de ligando de Nanobodies CXCR4

Se analizaron Nanobodies CXCR4 para determinar su capacidad para competir con el ligando CXCL12 (o SDF-1a) para su unión al receptor, mediante el desplazamiento de SDF-1 biotinilado en células Caki-CXCR4 en citometría de flujo. Para este fin, se incubaron diluciones en serie de Nanobodies con 30 nM de SDF-1 biotinilado (kit de fluorocina de R&D Systems) en células, tras lo cual se visualizó la unión de ligando usando extravidina-PE. La concentración del competidor biotina-SDF-1 usada en este ensayo estaba por debajo del valor de CE50 obtenido en la titulación de la dosis, en el que los valores de CI50 deben reflejar la Ki.

Este ensayo confirmó que la diferencia en afinidades aparentes entre los miembros de la familia 14A09 y 14A02 se traduce en diferencias similares en capacidad en competición de ligandos (Figura 3, panel C). De esta manera, se asegura que el Nanobody 14D09 (también denominado 14D9) es un competidor de ligando y que la mejora de su afinidad puede conducir a potencias mejores (cuando una potencia menor no puede mostrar una competición de SDF-1 eficaz).

Se analizaron Nanobodies CXCR4 en un ensayo de desplazamiento de radioligando en extractos de la membrana de células Hek-CXCR4. La ventaja de usar el ligando radiomarcado es la sensibilidad aumentada, y la baja

concentración de competidor garantiza la determinación de valores de K_i (es decir, la constante de afinidad real) en lugar de medir el valor de CI_{50} . Esto hace posible determinar con precisión las potencias de Nanobodies de baja afinidad, aunque no puedan alcanzar un desplazamiento completo.

5 Para este fin, se incubaron extractos de la membrana de células Hek293 transfectadas con CXCR4 con diluciones en serie de Nanobodies purificados y 75 pM de [^{125}I]-CXCL12. La unión no específica se determinó en presencia de SDF-1 frío 100 nM. Como controles, se incluyeron Nanobodies CXCR4 de bloqueo completo 238D4 y 281A6. El ensayo se realizó tres veces, y se calcularon porcentajes promedio de inhibición de SDF-1.

10 En la figura 1.3, panel D, se muestra que el Nanobody 281F12 tuvo solo una potencia moderada, con una K_i de 27 nM, y solo eficacia parcial, mientras que los Nanobodies CXCR4 de control 238D4 mostraron una eficacia completa. Esto convierte a 281F12 en otro candidato adecuado para su uso en el formateo para dar constructos biespecíficos con Nanobodies IL-3Ra.

15 La tabla 4 enumera las características de Nanobodies CXCR4 de afinidad de baja a moderada, así como de sus miembros de la familia respectivos.

Ejemplo 1.5: Polipéptidos biespecíficos

20 En el presente ejemplo, los inventores combinaron los diferentes Nanobodies anti-CXCR4 y anti-CD123 que se identificaron y caracterizaron en los experimentos anteriores, y cuyas características se resumen en la tabla 5. Los polipéptidos biespecíficos resultantes se sometieron a prueba posteriormente para determinar su especificidad. En particular, se elaboraron ocho constructos, que se resumen en la tabla 6.

25 Ejemplo 1.5.1. Clonación, producción y caracterización física

Se clonaron Nanobodies IL3Ra y CXCR4 en el vector de producción pAX138 y se expresaron como proteínas etiquetadas con Myc-His6 para construir polipéptidos biespecíficos. Se construyeron ocho combinaciones de los Nanobodies CXCR4 14D09 (denominados CXCR4#1) y 281F12 (denominados CXCR4#2) y los Nanobodies IL-3Ra 57A07 (denominados CD123#1) y 55A01 (denominados CD123#2) (véase la tabla 6). Los Nanobodies se conectaron con un ligador largo flexible de (GGGGS)₇ repetitivo. Se amplificaron los Nanobodies individuales en reacciones de PCR separadas para generar fragmentos N-terminales y fragmentos C-terminales usando cebadores que contenían sitios de restricción apropiados. Los fragmentos se insertaron secuencialmente en el vector de expresión pAX138 para producciones de *E. coli*. La secuencia de nucleótidos correcta de todos los constructos se confirmó mediante análisis de secuencia (véase la tabla 7, constructos biespecíficos). Posteriormente, volvieron a clonarse los constructos correctos en el vector pAX205 para su producción en *Pichia pastoris* como proteínas etiquetadas con Flag3-His6. Se linealizaron plásmidos que codificaban para constructos biespecíficos mediante digestión con enzimas de restricción antes de su transformación en la cepa de *P. pastoris* X-33. Se realizaron expresiones de prueba a pequeña escala de transformantes de *P. pastoris* para seleccionar el clon con buenos niveles de expresión. Para ello, se realizaron expresiones a escala de 4 ml de 4 clones de cada constructo en placas de pocillos profundos de 24 pocillos. La expresión de Nanobodies en el medio se evaluó mediante SDS-PAGE. Se recogieron las fracciones del medio y se usaron como material de partida para cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) usando Nickel Sepharose™ 6 FF. Se eluyeron los Nanobodies de la columna con imidazol 250 mM y se desalaron posteriormente en Sephadex G-25 Superfine en el Atoll (ATO002) hacia dPBS. La pureza y la integridad de los Nanobodies se verificó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western usando detección anti-VHH y anti-tag.

Se produjeron Nanobodies monovalentes específicos de CXCR4 e IL-3Ra en *E. coli* y se expresaron como proteínas etiquetadas con His6, FLAG3 unidas al extremo C-terminal, en el vector de expresión pAX129 tal como se muestra en el ejemplo 1.2.

Ejemplo 1.5.2. Caracterización de polipéptidos biespecíficos CXCR4-IL-3Ra

Para evaluar si el formateo para dar constructos biespecíficos afectaba a la capacidad de unión a diana de los Nanobodies individuales, se analizaron los Nanobodies biespecíficos para determinar la unión a IL-3Ra recombinante (R&D Systems) en ELISA y a lipopartículas virales de CXCR4 (Integral Molecular). La figura 1.4 muestra que la capacidad de unión a IL-3Ra de los Nanobodies CD123#1 (57A07) y CD123#2 se mantiene en todos los biespecíficos. Sin embargo, la unión a CXCR4 de constructos con o bien CXCR4#1 o bien CXCR4#2 se mantiene sólo en una orientación, cuando el Nanobody CXCR4 está en la posición N-terminal. Los constructos biespecíficos en los que el Nanobody CXCR4 se posiciona en el extremo C-terminal muestran una pérdida de 50-100 veces en unión a CXCR4-VLP.

Ejemplo 1.5.3. Líneas celulares leucémicas que expresan CXCR4 e IL-3Ra

65 Se usaron líneas celulares leucémicas con diferentes niveles de expresión de CXCR4 y CD123 así como células

Jurkat para evaluar las características de unión de los polipéptidos biespecíficos CXCR4-IL-3Ra y sus homólogos monovalentes. Se confirmó la expresión de la diana mediante análisis de FACS con anticuerpo anti-hCXCR4 12G5 (R&D Systems, MAB170) y anticuerpo anti-hIL-3Ra 7G3 (BD Pharmingen, 554527), seguido por anticuerpo secundario de cabra anti-PE de ratón (Jackson Immuno Research).

Los resultados se representan en la figura 1.5.

Las células MOLM-13 y las células THP-1 tienen diferentes niveles de expresión relativos de CXCR4 e IL3Ra, siendo la expresión de hIL3Ra mayor en comparación con CXCR4 en células Molm-13 que en THP-1. Las células U937 expresan los niveles más altos de CXCR4 y prácticamente no expresan IL-3Ra.

Ejemplo 1.5.4. Análisis de unión de CXCR4-CD123

Se analizó la unión de polipéptidos biespecíficos en ambas orientaciones en células U937 que expresan sólo CXCR4, y células MOLM-13 y THP-1 que expresan ambas dianas a diferentes razones. Los gráficos representativos se muestran en la figura 1.6. En las orientaciones CXCR4-IL-3Ra, la afinidad de los Nanobodies biespecíficos se mejora en células Molm-13 en comparación con el Nanobody monovalente CXCR4, en las que la CE50 refleja aquellas del Nanobody monovalente IL-3Ra respectivo presente en el constructo. Además de un cambio en el valor de CE50, también parece que la unión total aumenta para los biespecíficos en los que se mantiene la afinidad para CXCR4 (orientación CXCR4-IL-3Ra). En células Molm-13, las curvas de unión de constructos en los que la unión a CXCR4 se reduce fuertemente (orientación IL-3Ra-CXCR4) se superponen con el Nanobody IL-3Ra respectivo. Esto está en línea con los niveles de expresión mayores de CD123 con respecto a CXCR4 en células Molm-13.

Las diferencias en los niveles de fluorescencia total entre células THP-1 y MOLM-13 indican que también los niveles de expresión relativos de los dos antígenos en la célula parecen contribuir también al comportamiento de unión de los polipéptidos biespecíficos CXCR4-IL-3Ra (figura 1.6).

Ejemplo 1.5.5. Mezcla de líneas celulares Jurkat E6-1 y MOLM-13

Se evaluó la capacidad de polipéptidos biespecíficos para unirse preferentemente a una célula que expresa tanto CXCR4 como CD123, en lugar de a una célula que expresa CXCR4 solo. Para este fin, se realizó un experimento de FACS con una población mixta de células doblemente positivas (MOLM-13) y CXCR4 solo (Jurkat E6-1), imitando la situación la vida real con poblaciones celulares heterogéneas. Con el fin de distinguir ambas poblaciones celulares, antes de la incubación con los Nanobodies, se marcaron las células MOLM-13 con CFSE 0,5 μ M (Molecular Probes, Life Technologies) y Jurkat E6-1 con PKH26 0,5 μ M (Sigma-Aldrich), según las instrucciones del fabricante. Tras mezclar ambas líneas celulares en el mismo pocillo a una razón de 1:1, se incubaron con diluciones en serie de 6 veces de los diferentes polipéptidos biespecíficos y bloques de construcción monovalentes correspondientes. La unión dependiente de la dosis de los Nanobodies se detectó a través de la etiqueta FLAG C-terminal usando anti-FLAG de ratón (Sigma-Aldrich), seguido por anti-IgG-APC de ratón (Jackson Immunoresearch) y se midió con FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company). Como control, también se evaluó la unión de Nanobody en cada línea celular sola.

Como consecuencia de la baja afinidad del polipéptido biespecífico en la orientación IL3Ra-CXCR4, no pudieron obtenerse valores de CE50 para estos constructos. Por tanto, se realizó una comparación directa entre la unión a células MOLM-13 (CXCR4+/CD123+) frente a Jurkat E6-1 (CXCR4+/CD123-) a una concentración de Nanobody (4,6 nM). La figura 1.7 indicó que se observó la unión preferencial a células MOLM-13 para los constructos biespecíficos en la orientación IL3Ra-CXCR4 (I-X), en la que la afinidad para CXCR4 estaba comprometida. Los constructos con la orientación inversa, en los que el monovalente CXCR4 está en el extremo N-terminal y se mantiene su afinidad, se unen a células tanto Jurkat E6-1 como MOLM-13 al mismo nivel aproximado, mostrando de ese modo una mejora en la unión a MOLM-13 a esta concentración.

Esto puede indicar que la afinidad de los Nanobodies CXCR4 usados actualmente (es decir, CE50 alrededor de 10 nM) todavía puede ser demasiado alta para obtener una ganancia en selectividad a través de la unión de biespecíficos. Para lograr esta unión preferencial, el resultado sugiere que la afinidad para CXCR4 puede ser incluso menor, por ejemplo, hasta el nivel de la unión residual de los constructos IL3Ra-CXCR4.

Ejemplo 1.5.6. Inhibición de quimiotaxia mediada por CXCR4

Para verificar si los polipéptidos biespecíficos CXCR4-IL3Ra muestran afinidad y potencia aumentadas en células que expresan ambos receptores, se llevó a cabo un ensayo funcional dependiente de CXCR4. Para este fin, se realizó quimiotaxia dependiente de SDF-1a en células Jurkat E6-1 (CXCR4+/IL3Ra-) y MOLM-13 (CXCR4+/IL3Ra+) para una comparación directa de células que expresan ambos o sólo un receptor. Dado que el bloqueo funcional solo está mediado a través de CXCR4, se espera que la aversez por la unión simultánea del Nanobody® anti-IL3Ra se traduzca en potencia aumentada en la inhibición de quimiotaxia.

Se analizaron polipéptidos biespecíficos para determinar la inhibición de quimiotaxia inducida por CXCL12 en células que expresan de manera endógena CXCR4. Como factor quimiotáctico, se usó una concentración de SDF-1a de 750 pM en 100.000 células/pocillo para la línea celular Jurkat, y 500.000 células/pocillo para la línea celular MOLM-13. En cada placa se incluyó el Nanobody monovalente CXCR4 correspondiente como referencia, lo que permite calcular el aumento en veces del polipéptido biespecífico dentro de cada placa. Como control adicional, se incluyeron mezclas 1:1 de Nanobodies monovalentes. Los gráficos representativos de los diferentes constructos durante se muestran en la figura 1.8. En la tabla 9, se muestran los valores de CI50 respectivos (promedio de n=3 experimentos).

Estos datos muestran una clara ganancia en potencia en inhibición de la función de CXCR4 para biespecíficos en la orientación CXCR4-IL-3Ra en células que expresan ambos antígenos, pero no en células que expresan sólo CXCR4. Este aumento no se observó cuando se usó una mezcla de los dos Nanobodies monovalentes, por tanto, depende de la ligación de los Nanobodies para la participación simultánea de las dianas. Las potenciaciones de la potencia para los constructos biespecíficos de Nanobody CXCR4#2 en células Molm-13 fueron de 12-15 veces. No parecía haber diferencia entre los dos Nanobodies IL-3Ra, lo que sugiere que la afinidad de 8 nM del bloque de construcción menor ya es suficiente para servir como anclaje. La ganancia en potencia es menos notable para los constructos biespecíficos del bloque de construcción CXCR4#1, en los que solo existe un aumento menor en comparación con el Nanobody monovalente. La potencia de CXCR4#1 es mayor que para CXCR4#2 (CI50 de 10 nM frente a 84 nM), lo que puede indicar que es demasiado alta para observar una mejora tras el formateo para dar uno biespecífico. Alternativamente, también es posible que este Nanobody se una a un epítipo diferente menos favorable en CXCR4, lo que limita el potencial de formateo.

Los gráficos representativos de los diferentes constructos se muestran en la figura 1.8. En la tabla 8, se muestran los valores de CI50 (n=2-3 experimentos).

Estos datos muestran que los polipéptidos biespecíficos muestran una ganancia en potencias, mejorando la potencia de los Nanobodies CXCR4 para inhibir la quimiotaxia inducida por SDF-1 de células MOLM-13 hasta 12-15 veces.

Ejemplo 2: Direccionamiento preferencial de células T con polipéptidos biespecíficos CD4-CXCR4

Ejemplo 2.1: Características de Nanobodies monovalentes para el formateo

Se identificó previamente un panel de Nanobodies CD4 a partir de bibliotecas inmunitarias con linfocitos de sangre periférica humanos. Además de su papel en células T, CD4 también sirve como receptor primario para la entrada de VIH1. Por tanto, se analizó un panel de Nanobodies CD4 para determinar la capacidad para bloquear la interacción con la proteína viral gp120. En resumen, se analizaron Nanobodies CD4 para determinar la capacidad para competir con la unión de proteína gp120 a CD4 recombinante en ELISA. En resumen, se recubrieron placas con anticuerpos anti-gp120 de oveja 20 ug/ml. Se capturó 1 ug/ml de proteína gp120 de VIH1 durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó previamente CD4 humana recombinante biotinilada (Invitrogen) a 0,5 µg/ml con Nanobodies anti-CD4 500 nM, o anticuerpos de control AcM anti-CD4 de ratón B-A1 y F5 (Diacclone) y Acp anti-CD4 de conejo (ImmunoDiagnostic Inc) durante 1 h, tras lo cual la mezcla se transfirió a las placas recubiertas y se incubó durante 1 h. La detección de CD4 unida se realizó con conjugado de extravidina-peroxidasa. La figura 2.1 muestra que se encontró sólo un clon para inhibir la interacción con gp120, es decir Nanobody 3F11. La unión a CD4 expresada en células de 3F11 se demostró mediante citometría de flujo en células MOLM-13 y células T humanas, usando detección de la etiqueta anti-flag, con afinidades aparentes de 0,76 nM. Las características de Nanobody CD4 se encuentran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: características de Nanobody monovalente CD4

Nanobody		Unión de FACS			Neutralización de VIH-1
	ID	CE50 de MOLM-13 (nM)	CE50 de THP-1 (nM)	CE50 de células T (nM)	CI50 de PBMC + NL4.3 (nM)
CD4#8	3F11	0,7	1,0	0,76	29,3

Ejemplo 2.2: Construcción de polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4

Se clonaron constructos del Nanobody anti-CD4 3F11, denominado CD4#8, y del Nanobody anti-CXCR4 282F12, denominado CXCR4#2, en el vector de producción pAX100. Este vector se deriva de pUC119 y contiene un promotor LacZ, un gen de resistencia a la kanamicina, un sitio de clonación múltiple, una secuencia líder OmpA, una etiqueta c-myc C-terminal y una etiqueta (His)6. Dado que ambas dianas actúan como correceptores para la entrada de VIH-1, se espera que estén muy cerca de la superficie celular. Por este motivo, se generaron polipéptidos biespecíficos con espaciadores flexibles de diferentes longitudes para la ligación de los dos bloques de construcción de Nanobody: (Gly₄SerGly₄) (9GS), (Gly₄Ser)₅ (25GS) y (Gly₄Ser)₇ (35GS), respectivamente. Se generaron constructos biespecíficos en ambas orientaciones, produciendo 8 constructos biespecíficos diferentes (tabla 2.2). La

secuencia de nucleótidos correcta de todos los constructos se confirma mediante análisis de secuencia (véase la tabla 10 para una visión general de todas las secuencias). Posteriormente, los constructos de Nanobody correctos volvieron a clonarse en el vector pAX205 para la producción en la levadura *Pichia pastoris* como proteínas etiquetadas con FLAG3-His6, tal como se describe en el ejemplo 1.2.

Tabla 2.2

Panel de Nanobodies CXCR4-CD4	
CD4#8-CXCR4#2	03F11-9GS-281F12
	03F11-25GS-281F12
	03F11-35GS-281F12
CXCR4#2-CD4#8	281F12-9GS-03F11
	281F12-25GS-03F11
	281F12-35GS-03F11

Ejemplo 2.3: Análisis de unión de polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4

Para evaluar si el formateo para dar constructos biespecíficos afectaba a la unión del Nanobody CXCR4#2 a CXCR4, se analizó todo el conjunto de polipéptidos biespecíficos para determinar la unión a CXCR4 en lipopartículas virales (Integral Molecular). En resumen, se recubrieron 2 unidades de VLP nulas y hCXCR4-VLP en placas Maxisorp durante la noche a 4°C. Al siguiente día, se bloquearon los sitios de unión libres usando leche desnatada Marvel al 4% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, tras lavar la placa 3x con PBS, se añadieron 100 nM, 10 nM, 1 nM y 0 nM de polipéptidos purificados a los pocillos recubiertos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar 3x con PBS, se detectaron los polipéptidos unidos con anticuerpos anti-c-myc de ratón (Roche, n.º de cat. 11667149001) y anticuerpos anti-HRP de ratón de conejo (DAKO, n.º de cat. P0260), ambos durante 1 h a temperatura ambiente. La unión se determinó basándose en los valores de D.O. y se comparó con los controles: un Nanobody irrelevante, un pocillo no recubierto, ambos bloques de construcción monovalentes originales y un anticuerpo anti-CXCR4 monoclonal de R&D (clon: 12G5, n.º de cat. MAB170). La figura 2.1 muestra los resultados de ELISA de unión. Se observa un efecto de la orientación para los constructos biespecíficos con el Nanobody CD4#8, y la unión de CXCR4 sólo se retuvo con el Nanobody CXCR4 ubicado en la posición N-terminal. Un cambio en la longitud del ligador no pudo superar esta pérdida de unión a diana del Nanobody CXCR4#2, excepto quizás para el constructo CD4#8-25GS-CXCR4#2, que parecía estar menos afectada que los otros dos polipéptidos biespecíficos con el resto CXCR4 en la posición C-terminal.

El panel de polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4 se analizó para determinar la unión dependiente de la dosis para líneas celulares con diferentes niveles de expresión relativos de las dos dianas en citometría de flujo. Se incubaron las células con disolución de bloqueo de Fc (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-059-901) durante 30 minutos antes de la tinción con anticuerpo anti-CXCR4 monoclonal 12G5 (R&D, n.º MAB170) y anticuerpo anti-CD4 monoclonal BA1 (Diacclone, n.º 854030000). Los polipéptidos unidos se detectaron con anticuerpos anti-c-myc de ratón (AbD Serotec, n.º de cat. MCA2200) y anticuerpos de cabra anti-PE de ratón (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 115-115-171), ambos durante 30 min con agitación a 4°C. La unión se determinó basándose en los valores de MCF y se comparó con los controles.

Los niveles de expresión de CD4 y CXCR4 en células Jurkat, células THP-1 y células Molm-13 se representan en la figura 2.3, así como las curvas de unión de polipéptidos biespecíficos a células Jurkat y Molm-13. Las células Jurkat E6.1 muestran una población de células heterogénea que expresa o no niveles bajos de CD4. El Nanobody monovalente CD4#8 sólo mostró un nivel de unión muy bajo a estas células, aunque el valor de CE50 fue similar al de células THP-1 y MOLM-13 (1,1 nM frente a 1,0 nM frente a 0,7 nM, respectivamente).

En células Jurkat, los Nanobodies CXCR4-CD4 tienen valores de CE50 similares a los monovalentes CXCR4#2, en línea con los altos niveles de expresión de CXCR4. Los Nanobodies tienen un nivel de fluorescencia ligeramente mayor que los Nanobodies monovalentes CXCR4. En células THP1 doblemente positivas, se observa un claro cambio en las curvas de los Nanobodies biespecíficos CXCR4-CD4 en comparación con ambos monovalentes, y los biespecíficos alcanzan niveles de meseta mucho mayores. Sin embargo, la diferencia en los valores de CE50 entre biespecíficos y monovalentes es sólo moderada (0,67 nM frente a 1,0 nM). En células MOLM-13, el valor de CE50 de los biespecíficos es similar al de CD4#8, y en este caso también se observan niveles de meseta aumentados. Las curvas de unión de estos biespecíficos CD4-CXCR4 de orientación inversa se superponen con el Nanobody monovalente CD4#8.

Este aumento en la fluorescencia total en citometría de flujo puede representar unión aditiva (unión a cada diana sola), así como unión simultánea a ambas dianas en la superficie celular, pero los ensayos de unión celular no permiten discriminar entre estos modos de unión.

Ejemplo 2.4: Inhibición de quimiotaxia mediada por CXCR4 mediante polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4

Para verificar si los polipéptidos biespecíficos CXCR4-IL-3Ra muestran afinidad y potencia aumentadas en células que expresan ambos receptores, se realizó un ensayo funcional dependiente de CXCR4. Dado que las células MOLM-13 expresan CD4 junto con CXCR4 y CD123, se usó la misma configuración experimental tal como se describe para los Nanobodies biespecíficos CXCR4-CD123 (véase: ejemplo 1.5.5).

La inhibición dependiente de la dosis de la quimiotaxia inducida por CXCL12 por el panel de Nanobodies biespecíficos CD4-CXCR4 se determinó en células Jurkat (CXCR4+/CD4 bajo) y Molm-13 (CXCR4+/CD4++). Como referencia, se incluyó anticuerpo anti-CXCR4 12G5 en cada placa. Los resultados de un ejemplo representativo se muestran en la figura 2.4, y los valores de CI50 se presentan en la tabla 2.3. Los constructos biespecíficos CXCR4#2-CD4#8 mostraron una fuerte potenciación de potencia (~150 veces) en células doblemente positivas en comparación con el Nanobody monovalente CXCR4#2, mientras que el Nanobody CD4 por sí mismo no tenía ningún efecto. De manera notable, los constructos biespecíficos en la orientación inversa eran capaces de bloquear la función de CXCR4, a pesar de su afinidad reducida para CXCR4 debido a la posición no favorable, aunque el bloqueo era parcial. Los aumentos de potencia mucho mayor observados con Nanobodies que seleccionan como diana la combinación de CD4 y CXCR4 se relacionan con la mayor probabilidad con los niveles de expresión relativos mayores de CD4 en comparación con CD123 en las células Molm-13.

Tabla 2.3: bloqueo de quimiotaxia mediada por SDF-1 mediante polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4.

Nanobody		células MOLM-13 CXCR4 ⁺ /CD4 ⁺			células Jurkat E6-1 CXCR4 ⁺ /CD4 ^{bajo}		
Nb1	Nb2	CE50 de unión (nM)	CI50 de quimiotaxia (nM)	Aumento en veces	CE50 de unión (nM)	CI50 de quimiotaxia (nM)	Aumento en veces
CXCR4#2		5,2	86,0	-	7,0	84,2	-
CXCR4#2	CD4#8	1,1	0,59	146	11	110	0,8
CD4#8	CXCR4#2	0,7	1,29	67	1,1	460	0,2
CD4#8		0,6	-	-	61	-	-

Ejemplo 2.5: Especificidad de CXCR4 en ensayos de infección por VIH1

Además de su papel fisiológico como receptor de quimiocinas homeostáticas, CXCR4 también se usa como correceptor para cepas de VIH linfotrópico T. Para la entrada de la célula huésped, la proteína viral gp120 interacciona con CD4 y un correceptor, que puede ser o bien CCR5 o bien CXCR4. Las cepas de VIH1 pueden ser o bien dependientes del uso de CCR5 (R5), del uso de CXCR4 (X4), o bien pueden ser doblemente trópicas, pudiendo usar cualquier receptor para la entrada.

La modulación de los correceptores o bien de CD4 o bien de quimiocinas son estrategias activas que están sometiéndose a prueba en el entorno clínico. Se anticipa un posible papel para los antagonistas de CXCR4 (por ejemplo, AMD3100) en el tratamiento de estadios avanzados de SIDA mediante la inhibición de CXCR4, ya que las cepas de VIH-1 X4 emergen tarde en esta enfermedad. Para determinar si el Nanobody CXCR4#2 también es capaz de bloquear la entrada de cepas de VIH1 que usan CXCR4, se realizaron ensayos de infección por VIH-1 con clones de VIH específicos de CXCR4 y CCR5. La especificidad de los efectos inhibidores de los Nanobodies monovalentes y biespecíficos CXCR4-CD4 se sometió a prueba en el clon NL4.3 de VIH-1 que usa CXCR4 (X4) que infecta células MT-4, o PBMC recién aisladas (CD4+/CXCR4+/CCR5+), y la cepa de VIH-1 que usa CCR5 (R5) BaL que infecta PBMC recién aisladas (CD4+/CXCR4+/CCR5+).

Ejemplo 2.5.1. Ensayos de infección por VIH-1

Las potencias anti-VIH-1 de todo el panel de polipéptidos biespecíficos CD4-CXCR4 y los Nanobodies monovalentes CXCR4#2 y CD4#8 se determinaron midiendo el efecto citopático de distintas cepas de VIH-1 en las líneas celulares MT-4 y U87, o mediante cuantificación de la producción de antígeno viral p24 en el sobrenadante de cultivo de PBMC.

Las cepas virales usadas fueron el clon NL4.3 de VIH-1 X4, la cepa de VIH-1 R5 BaL o la cepa de VIH-1 R5/X4 HE. La infección se realizó en células MT-4 o PBMC estimuladas por fitohemaglutina de diferentes donantes sanos. El clon NL4.3 de VIH-1 que usa CXCR4 (X4) se obtuvo del programa de reactivos del SIDA de los Institutos Nacionales de Salud NIAID (Bethesda, MD), la cepa de VIH-1 que usa CCR5 (R5) BaL se obtuvo del Proyecto de reactivos del sida del Consejo de Investigación Médica (Herts, Reino Unido). La cepa de VIH-1 doblemente trópica (R5/X4) HE se aisló inicialmente de un paciente en el Hospital Universitario en Leuven. Las células MT-4 se sembraron en una placa de 96 pocillos y las células U87 en placas de 24 pocillos. Los Nanobodies se añadieron a diferentes concentraciones junto con VIH-1 y las placas se mantuvieron a 37°C en el 10% de CO₂. El efecto citopático inducido por el virus se monitorizó mediante evaluación microscópica diaria de los cultivos celulares infectados por virus. En el día 4-5 tras la infección, cuando se observó un fuerte efecto citopático en el control positivo (es decir, células infectadas por VIH sin tratar), la viabilidad celular se evaluó a través de la reducción *in situ* del compuesto de tetrazolio MTS, usando el ensayo de proliferación celular en disolución CellTiter 96® AQueous One (Promega,

Madison, WI). La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y se comparó con cuatro replicados de control celular (células sin virus ni fármacos) y cuatro pocillos de control con virus (células infectadas por virus sin fármacos). La CI_{50} , es decir, la concentración de fármaco que inhibe la muerte celular inducida por VIH en un 50%, se calculó para cada polipéptido a partir de la curva dosis-respuesta. La CC_{50} o la concentración citotóxica al 50% de cada uno de los polipéptidos se determinó a partir de la reducción de la viabilidad de células sin infectar expuestas a los agentes, tal como se mide mediante el método de MTS descrito anteriormente.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos mediante centrifugación por densidad (Lymphoprep; Nycomed Pharma, AS Diagnostics, Oslo, Noruega) y se estimularon con fitohemaglutina durante 3 días. Las células activadas se lavaron con PBS y se realizaron infecciones virales tal como se describió previamente (Schols *et al.* J Exp Med 1997; 186:1383-1388). A los 8-10 días tras el inicio de la infección, se detectó Ag viral p24 en el sobrenadante de cultivo mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Perkin Elmer, Bruselas, Bélgica).

Los resultados de la neutralización de VIH1 se representaron como valores de CI_{50} en la tabla 2.4. En células MT-4 infectadas con la cepa NL4.3, el Nanobody CXCR4#2 inhibió específicamente la entrada anti-VIH1 X4 a través de CXCR4, pero no la unión a CCR5. El Nanobody CD4#8 estaba bloqueando eficazmente ambas infecciones por VIH1 X4, con un valor de CI_{50} similar que el del monovalente CXCR4. En este ejemplo, el Nanobody CD4 no sirve exclusivamente como anclaje, sino que también contribuye al bloqueo funcional. Los polipéptidos biespecíficos CXCR4#2-CD4#8 eran extremadamente potentes en la inhibición de la replicación del virus VIH-1 X4, especialmente cuando se evaluó en PBMC estimuladas con PHA. Los aumentos de potencia para el mejor constructo biespecífico CXCR4-CD4 con el ligador más corto fueron de entre 250-320 veces en comparación con el Nanobody monovalente CXCR4#2. Los Nanobodies biespecíficos en la orientación inversa, con la afinidad reducida hacia CXCR4, fueron menos activos en este ensayo funcional. Por tanto, la unión simultánea tanto a CXCR4 como a CD4 de los Nanobodies biespecíficos CXCR4-CD4 da como resultado potencias fuertemente potenciadas en la neutralización de VIH1 que usa CXCR4.

Tabla 2.4: especificidad para la cepa NL4.3 de CXCR4-VIH1 trópica y la CCR5-BaL trópica.

CI_{50} (nM) n=3	MT-4 + NL 4.3(X4)	U87 + NL 4.3 (X4)	PBMC + NL 4.3(X4)	PBMC + BaL(R5)
Nanobody				
CD4#8	66,67	>1333	580	610
CXCR4#2	67,11	>6666	29,3	>1666
CD4#8-9GS-CXCR4#2	14,89	>3333	17,0	>666
CD4#8-25GS-CXCR4#2	9,22	>3333	8,67	383,33
CD4#8-35GS-CXCR4#2	11,67	>3333	23,7	35,9
CXCR4#2-9GS-CD4#8	0,20	0,53	0,03	
CXCR4#2-25GS-CD4#8	0,21	2,67	0,12	
CXCR4#2-35GS-CD4#8	0,24	2,67	0,37	2,46
AMD3100	4,75	10	1,91	

Ejemplo 2.5.2. Especificidad

La potencia del Nanobody CXCR4 es específica para las cepas de VIH1 que dependen del uso de CXCR4 para la entrada. Una posible desventaja de bloqueo de sólo uno de los correceptores de VIH1 es que pueden desencadenar la reparación del subtipo de VIH que no se selecciona como diana originalmente. En el caso del virus de VIH dependiente de CCR5 BaL, sólo el Nanobody CD4 en el constructo biespecífico contribuye a la neutralización del virus en PBMC. Dado que CXCR4 se expresa en PBMC, en estas células el Nanobody CXCR4 en el biespecífico puede servir como anclaje para potenciar la potencia de inhibición del Nanobody CD4. De hecho, el CXCR4-CD4 biespecífico con el ligador más largo tiene unos valores de CI_{50} de 2,5 nM para BaL, potenciaciones de alrededor de 200 veces con respecto al monovalente CD4#8, y son inhibidores de infección más potentes que los constructos en la orientación inversa, en la que se altera la afinidad de unión a CXCR4. Para los biespecíficos CD4-CXCR4, parece que un ligador más largo proporciona una mejor inhibición, lo que sugiere que esto favorece la unión al CXCR4 como anclaje.

Ejemplo 2.5.3. Inhibidor de entrada resistente a VIH-1 NL4.3

Para probar la contribución del Nanobody CXCR4 como anclaje en el polipéptido biespecífico, se evaluó el bloqueo de la infección por VIH para un panel de mutantes de VIH1 que se hizo resistente para el inhibidor de molécula pequeña de CXCR4 AMD3100, el ligando CXCR-4 o el anticuerpo de control 12G2. Además, se generaron mutantes de escape viral para el bloqueo de cada uno de los Nanobodies monovalentes, cultivando NL4.3 en presencia de polipéptidos a una concentración CI_{90} durante múltiples pases. Por tanto, los clones virales resistentes que se identificaron se usaron para someter a prueba las potencias de polipéptidos biespecíficos en comparación con los polipéptidos monovalentes. Los valores de CI_{50} se presentan en la tabla 2.5.

Los valores de CI50 de los Nanobodies biespecíficos CXCR4-CD4 hacia virus resistente a AMD3100 se representan en la figura 2.5. El monovalente CXCR4#2 mostró una pérdida en potencia de 100 veces, similar a AMD3100, mientras que la potencia de CD4 no se vio afectada. Cada uno de los Nanobodies biespecíficos CXCR4-CD4 había retenido potencias por debajo de 1 nM para bloquear la infección de virus resistente a AMD3100, 20 veces mejor que el bloque de construcción monovalente CD4. Sobre el panel completo de virus resistentes, el polipéptido CXCR4#2-CD4#2 retuvo una fuerte potencia de neutralización con valores de CI50 entre 0,3-1,1 nM. Por tanto, los polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4 parecen relativamente insensibles a mutantes que no ya se unen más a una de las dianas. Juntos, estos resultados indican que los polipéptidos biespecíficos tienen una amplia cobertura en diferentes cepas de VIH (véase la tabla 2.6) y una alta potencia uniforme en el bloqueo de infecciones por virus, y que la funcionalidad en sólo uno de los miembros de los polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4 ya es suficiente para la inhibición potente de estos compuestos en la entrada de VIH.

Tabla 2.5: perfil de actividad anti-VIH de Nanobodies hacia variantes de NL4.3 resistentes a VIH-1 del inhibidor de entrada en células MT-4.

CI50 (M)	MT-4					
Nanobody	NL4.3 de tipo natural	CD4#8 res.	CXCR4#2 res.	AMD-3100 res.	CXCL-12 res.	2G12 res.
CD4#8	3,47E-08	>6,7E-06	>6,7E-06	2,27E-08	1,53E-07	2,33E-08
CXCR4#2	2,27E-08	8,73E-08	2,33E-06	>1,67E-06	2,20E-07	1,73E-08
CXCR4#2-35GSCD4#8	1,87E-10	3,10E-10	1,40E-09	1,13E-09	4,33E-10	1,10E-10
CD4#8-35GSCXCR4#2	6,00E-09	9,57E-08	>3,1E-07	1,40E-08	7,00E-08	3,00E-09
AMD3100	4,28E-09	1,85E-08	3,99E-07	4,04E-07	5,03E-08	

Tabla 2.6: perfil de actividad anti-VIH de Nanobodies hacia distintas cepas de VIH en células MT-4.

CI50 (M)	MT-4 +		
Nanobody	VIH-1 NL4.3	VIH-1 HE	VIH-2 ROD
CD4#8	3,47E-08	1,00E-08	2,27E-08
CXCR4#2	2,27E-08	1,00E-08	8,67E-08
CXCR4#2-35GS-CD4#8	1,87E-10	9,06E-11	3,00E-10
CD4#8-35GS-CXCR4#2	6,00E-09	2,00E-09	8,75E-09
AMD3100	4,28E-09	3,90E-09	2,11E-08

Ejemplo 3: Direccionamiento preferencial de subconjuntos de células T con polipéptidos biespecíficos CD4-IL12Rβ2 y CD4-IL23R

Ejemplo 3.1: Características de Nanobodies monovalentes usados para el formateo

Para generar polipéptidos biespecíficos con la capacidad de bloqueo preferencial de subconjuntos de células T específicas, se combinaron Nanobodies dirigidos contra diferentes receptores de interleucina específicos de subconjuntos con un Nanobody dirigido contra la glicoproteína CD4. En el brazo funcional, se usó el IL-12Rβ2 como marcador para el subconjunto de células T_{H1}, y el IL-23R como marcador para células T_{H17}. Ambos receptores pertenecen a la misma familia de receptores de interleucina 12 y usan el mismo correceptor IL-12Rβ1 para formar un heterodímero funcional. Por este motivo, se generaron también constructos biespecíficos de IL-12Rβ1 y CD4, ya que se espera que estos seleccionen como diana ambos subconjuntos de células T y puedan servir de ese modo como control positivo. Se usa un Nanobody de anclaje dirigido contra la glicoproteína CD4 para proporcionar avidez y para prevenir el bloqueo de receptores en otras células inmunitarias, tales como células T CD8+, células B, linfocitos citolíticos naturales y determinadas células mieloides.

Para este ejemplo, se usó Nanobody 3F11 dirigido contra la glicoproteína CD4 como anclaje común. Este Nanobody es específico para CD4 humana expresada en células, y muestra sólo una baja unión a proteína CD4 recombinante, y se usó en la generación de polipéptidos biespecíficos CXCR4-CD4 (véase el ejemplo 2). Los Nanobodies específicos para IL-23R, IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 se identificaron previamente como Nanobodies de competición de ligandos. Para identificar Nanobodies de competición de ligandos con bajas afinidades suficientes para el formateo, se caracterizaron Nanobodies monovalentes de familias con múltiples miembros de la familia con respecto a la cinética de unión, la capacidad para competir con ligandos y la unión a receptores expresados en células en células primarias.

Ejemplo 3.1.1. SPR

Las afinidades de unión precisas de los Nanobodies purificados se determinaron en un análisis de cinética de múltiples ciclos usando análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore T100) en fusiones de Fc de dominios extracelulares de IL12R β 1, IL12R β 2 e IL-23R humanos (R&D Systems, #839-B1, #1959-B2, #1400-IR). Se inmovilizaron chips sensores CM5 con anticuerpo anti-hlgG (GE Healthcare, BR-1008-39), tras lo cual se capturaron los receptores a 5 μ g/ml de proteína y un tiempo de contacto de 120 segundos. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+ (GE Healthcare, BR-1006-69) a 25°C, con una velocidad de flujo de 5 ml/min. Para la inmovilización mediante el acoplamiento de aminos, se usó EDC/NHS para la activación y clorhidrato de etanolamina para la desactivación (Biacore, kit de acoplamiento de aminos). Los Nanobodies se evaluaron a un intervalo de concentración de entre 1,37 nM y 3 μ M. Se dejaron asociar los Nanobodies durante 2 min y disociar durante 15 min a una velocidad de flujo de 45 ml/min. Entre inyecciones, se regeneraron las superficies con un pulso de 3 min de MgCl₂ 3 M y un periodo de estabilización de 2 min. La evaluación de los datos de asociación/disociación se realizó ajustando a un modelo de interacción 1:1 (modelo de unión de Langmuir) mediante el software Biacore T100 v2.0.3. Las velocidades de disociación y las constantes de afinidad se muestran en la tabla 3.1.

Ejemplo 3.1.2. Competición por la unión de IL-12 e IL-23 en ELISA

La capacidad de los Nanobodies monovalentes de competir con la unión de proteínas de Fc-receptor de IL12 a IL-12 se evaluó en un ELISA de competición en IL-12 humana recubierta (10 nM, Peprotech #200-12B) en una placa de microtitulación SpectraPlate HB de 384 pocillos (Perkin Elmer). Se bloquearon los sitios de unión libres con caseína al 1% en PBS. Se incubaron diluciones en serie de Nanobodies con una concentración fija de o bien IL12R β 1-Fc 2 nM o bien IL12R β 2-Fc 3 nM durante 1 h. La concentración de competidores se basó en experimentos de titulación de la dosis, y las concentraciones finales usadas fueron valores <CE₅₀. La unión residual de IL12R β 1-Fc o IL12R β 2-Fc se detectó usando un anticuerpo anti-hlgG de cabra conjugado con HRP (1/3000, Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-035-088) y una posterior reacción enzimática en presencia del sustrato esTMB (SDT reagents).

Se usaron configuraciones de ensayo similares para medir la competición de Nanobodies IL-23R e IL12R β 1 para su unión a IL-23. Se usó un recubrimiento de IL-23 humana (eBioscience 34-8239-82) a 20 nM para la competición con IL-23R-Fc 5 nM, se usó un recubrimiento de 3 nM para la competición de IL12R β 1-Fc 2 nM. Los valores de CI₅₀ se muestran en la tabla 3.1. La diferencia en la capacidad de competición de ligandos entre los miembros de la familia para cada una de las subunidades del receptor de IL12 se correlaciona bien con la diferencia en los valores de K_D medidos.

Ejemplo 3.1.3. Citometría de flujo

La unión dependiente de la dosis de Nanobodies monovalentes a su receptor expresado en células en el contexto del complejo heterodimérico se determinó mediante citometría de flujo en células T humanas activadas de distintos donantes sanos.

Se aislaron células T humanas usando el cóctel de enriquecimiento de células T humanas (RosetteSep #15061) y se preactivaron durante cuatro días con Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco - Life Technologies #11131D) y un día con IL-2 humana recombinante (Life Technologies - Gibco #PHC0027) para inducir la diferenciación de T_{H1}. De manera rutinaria, se comprobó el estado de activación y la expresión superficial de los marcadores de células T mediante FACS usando anti-CD3-PE (eBioscience #12-0037-73), anti-CD8-PE (BD Bioscience #555367), anti-CD45RO-PE (BD Bioscience #555493), anti-CD45RA-APC (BD Bioscience #550855), anti-CD25-PE (BD Bioscience #557138) y anti-CD69-PE (BD Bioscience #557050). La expresión superficial de IL12R se confirmó mediante FACS usando anticuerpo de IL12R β 1 (R&D MAB839), seguido por anticuerpo de cabra anti-PE de ratón (Jackson Immuno Research 115-115-164). La expresión de IL23R se comprobó mediante anticuerpo policlonal anti-IL-23R de cabra (R&D AF1400). La expresión superficial de CD4 se confirmó mediante FACS usando anticuerpo anti-CD4 marcado con APC (BD Bioscience #345771). En la figura 3.1 se muestran los niveles de expresión de IL12R β 1, IL23R y CD4 en células T de un donante activadas con este protocolo con anticuerpos de control. Para IL12R β 2, ninguna de las herramientas disponibles comercialmente mostró una unión sustancial.

Dado que la expresión de IL23R era muy baja en la agrupación de células T, se evaluó la unión de Nanobodies monovalentes IL23R en células que se diferenciaron hacia el fenotipo Th17 mediante la incubación de PBMC en presencia de un cóctel de citocinas e IL-23, IL-6 recombinante (eBioscience #34-8069-82), TGF- β 1 recombinante (R&D #240-B), anticuerpo anti-IL-4 humano (BD#554481), IL-1 β recombinante (BD#554602) e IL-23 humana recombinante (R&D Systems #219-IL-005) con coestimulación de OKT-3 recubierto con placa (eBioscience #16-0037-85), CD28 PeliCluster (Sanquin #M1650). Tras este procedimiento, se obtuvieron niveles de expresión de IL23R bajos pero detectables. La optimización en el protocolo de diferenciación de Th17 pudo aumentar adicionalmente estos niveles de expresión.

La unión dependiente de la dosis de Nanobodies monovalentes se evaluó mediante citometría de flujo en las poblaciones de células T enriquecidas con Th1 o Th17 respectivas. Se dejaron asociar diluciones en serie de

anticuerpo o Nanobodies durante 30 minutos a 4°C en tampón de FACS (PBS complementado con FBS al 10% y azida al 0,05%). Se lavaron las células mediante centrifugación y se probaron con anticuerpos anti-FLAG (Sigma F1804) durante 30 minutos a 4°C, para detectar Nanobody unido. La detección se realizó con anticuerpo de cabra anti-IgG-PE de ratón (Jackson ImmunoResearch #115-116-071) durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron las células y se incubaron con TOPRO3 para teñir las células muertas, que luego se retiraron durante el procedimiento de activación. Luego se analizaron las células a través de un BD FACSArray.

Las curvas de unión de Nanobodies específicos se muestran en las figuras 3.2 y 3.3. Los Nanobodies monovalentes pueden unirse específicamente a IL12Rβ1 expresado en células, respectivamente IL12Rβ2, en presencia del complejo de receptor heterodimérico (figura 3.2). La diferencia en afinidad de unión de los miembros de la familia de IL12Rβ1 se traduce claramente en diferentes afinidades aparentes de unión a células, mientras que los valores de CE_{50} de los dos miembros de la familia de IL12Rβ2 en estas células son muy similares. En cada caso, el Nanobody con la velocidad de disociación más rápida alcanza normalmente un menor nivel de meseta. Debido a su rápida velocidad de disociación, las curvas de unión estaban incompletas para IL12Rβ1#31 con respecto a la saturación de unión.

La unión específica de los Nanobodies IL-23R e IL12Rβ1 con la afinidad más alta se observó en la población enriquecida con T_{H17} , aunque las señales de fluorescencia fueron muy bajas (figura 3.3). Esto puede indicar que el % de células T_{H17} que expresan IL23R en la agrupación de células T todavía es relativamente bajo para obtener curvas dosis-respuesta con Nanobodies monovalentes de baja afinidad.

Las características de los Nanobodies IL-23R, IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 seleccionados para el formateo para dar Nanobodies biespecíficos se presentan en la tabla 3.1. Se propuso como objetivo seleccionar Nanobodies con distintas velocidades de disociación pertenecientes a la misma familia, es decir con conservación de secuencia en sus regiones CDR3, de manera que se conservó el epítipo en la diana y pudo abordarse el efecto de afinidad. Idealmente, se eligieron Nanobodies con velocidades de disociación $>10^{-4} s^{-1}$, para maximizar el efecto de avidéz proporcionado por el Nanobody de anclaje. Las secuencias de los dos Nanobodies IL12Rβ2 seleccionados difieren en tres aminoácidos en las regiones CDR1 y CDR2, y muestran una diferencia de 3,5 veces en K_D y capacidad de competición de ligandos debido a una diferencia en la velocidad de disociación. Los dos Nanobodies IL12Rβ1 seleccionados difieren en seis aminoácidos en las regiones CDR1 y CDR3, con una diferencia de 6-7 veces en K_D y competición de ligandos. Para los Nanobodies IL23R, se demostró que no era factible identificar dos miembros de la familia con una diferencia sustancial en la velocidad de disociación. Por tanto, para este receptor, se seleccionaron dos Nanobodies de competición de ligandos con diferentes velocidades de disociación rápidas de familias distintas, de ese modo con epítopos potencialmente diferentes. Aunque la unión a células no pudo medirse siempre con precisión para los Nanobodies con velocidades de disociación rápidas ($>1.E^{-02}$), los ensayos de competición de ligandos demostraron un bloqueo funcional con CI50 que oscilaba entre 10-16 nM para todos los Nanobodies monovalentes seleccionados.

Ejemplo 3.2: Generación de Nanobodies biespecíficos

El formateo de polipéptidos biespecíficos CD4-IL-12Rβ2, CD4-IL-12Rβ1 y CD-IL-23R se realizó mediante fusión genética de Nanobodies ligados con un ligador flexible largo (GGGGS)₇, con los bloques de construcción en ambas orientaciones. Para cada combinación, se combinaron dos Nanobodies específicos de receptor de bloqueo funcional con un Nanobody anti-CD4, CD4#8 3F11 (figura 3.4). La secuencia de nucleótidos correcta de todos los constructos se confirmó mediante análisis de secuencia (véase la tabla 12 para una visión general de todas las secuencias). Los Nanobodies se generaron como proteínas etiquetadas con flag3-His6 para su expresión en la levadura *Pichia pastoris* X-33, y se purificaron del medio de cultivo usando cromatografía de afinidad convencional, seguido por cromatografía de exclusión molecular. Todas las proteínas se confirmaron libres de endotoxinas para su uso en ensayos en células primarias.

Ejemplo 3.3: Análisis de unión de Nanobodies biespecíficos

Ejemplo 3.3.1. Efecto del formateo

Para evaluar si la orientación del Nanobody tras el formateo afecta a la unión y funcionalidad al receptor de interleucina respectivo, se analizaron Nanobodies biespecíficos y monovalentes purificados para determinar la competición con fusiones hIL-12Rβ1-Fc, hIL-12Rβ2-Fc o IL-23R-Fc para la unión de ligandos (véase anteriormente). La inhibición dependiente de la dosis de ambos Nanobodies monovalentes y biespecíficos se llevó a cabo para determinar los valores de CI_{50} para la competición en placas recubiertas con IL-12 humana. De manera similar, se realizó un ELISA de competición en placas recubiertas con IL-23 humana para evaluar la funcionalidad de los biespecíficos de los Nanobodies IL-23R e IL-12Rβ1. Los valores de CI_{50} se muestran en las tablas 3.2 y 3.3.

En el caso de CD4, se evaluaron los efectos de la orientación mediante citometría de flujo, comparando la unión de Nanobodies monovalentes y polipéptidos biespecíficos a células MOLM-13 que expresan CD4 pero carecen de

IL12R e IL23R. La expresión de CD4 se confirmó mediante FACS usando el anticuerpo anti-CD4 humano APC (BD Bioscience, #53384). La figura 3.5 muestra que el formateo para dar polipéptidos biespecíficos no afectó sustancialmente a la unión del bloque de construcción de CD4 a CD4 expresada en células. Los polipéptidos biespecíficos mostraron una unión comparable a la del Nanobody monovalente CD4#8, con la excepción de IL23R#19-CD4#8 (BI#42), que mostró una pequeña disminución en la afinidad de unión. Ninguno de los Nanobodies monovalentes IL12Rβ2, IL12Rβ1 e IL23R se unió a células MOLM-13, lo que confirma la ausencia de la expresión del receptor de IL12 e IL23.

Ejemplo 3.3.2. Especificidad

La unión dependiente de la dosis de polipéptidos biespecíficos se evaluó en células T humanas que se activaron para aumentar los niveles de expresión de IL12R. Las células T activadas mostraron niveles de expresión relativos moderados del antígeno de IL12R, pero una muy alta expresión de CD4, reflejada en la alta afinidad aparente y la alta señal de fluorescencia del Nanobody anti-CD4. La unión simultánea los dos receptores diana no es evidente, ya que las curvas de unión de todos los Nanobodies biespecíficos se superponen con aquellas del Nanobody monovalente CD4, proporcionando valores de CE50 similares (figura 3.6).

La agrupación de células T activadas comprende tanto células T CD4+ como células T CD8+. Para confirmar la especificidad del Nanobody anti-CD4 y para excluir la unión a células negativas para CD4, se evaluó la unión a células T CD8+ citotóxicas aisladas de PBMC humanas usando el kit de aislamiento de células T CD8+ (Miltenyi Biotec, 130-096-495), dando como resultado una pureza del 94% de células CD8+. Los experimentos de especificidad de unión se llevaron a cabo usando Nanobodies a 250 nM. No se observó unión con el Nanobody anti-CD4, mientras que el monovalente IL12Rβ1#30 se unió a células T CD8+ aisladas (figura 3.7). Además, el polipéptido biespecífico IL12Rβ1#30-CD4#8 se unió a estas células en un nivel similar al del Nanobody monovalente IL12Rβ1#30, sin efecto adicional del anclaje CD4. Se obtuvieron datos similares para los Nanobodies IL12Rβ2 e IL23R. Estos resultados indican que los biespecíficos de CD4 con los receptores específicos de subconjunto no se unen a células T CD8+ citotóxicas pero interaccionan específicamente con células T CD4+.

Para dilucidar si los polipéptidos biespecíficos CD4-IL12R se unen preferentemente al subconjunto de células T_{H1} CD4+/IL12R+ dentro de la agrupación de células T, se analizó la unión del Nanobody a una agrupación de células T activadas para o bien CD8 (detectado mediante anticuerpo monoclonal conjugado con anti-CD8 hu PE-Cy7 (BD 557746) o bien CD4 (detectado mediante anticuerpo policlonal conjugado con anti-CD4 hu Alexa Fluor 488 (R&D FAB8165G) en un experimento de FACS multicolor. La unión del Nanobody a las células activadas por CD8+/CD4 y a las células activadas por CD4+ se determinó usando detección de anti-flag-APC (Prozyme PJ255). En este experimento, se usaron células T activadas por T_{H1} del mismo donante (D838) tal como se muestra en la figura 3.6. El Nanobody CD4#8 mostró una fuerte unión a la población activada por CD4+, tal como se indica por los altos niveles de fluorescencia (figura 3.8, panel E, pico de color gris claro), mientras que sólo se observó una baja señal para la población de CD8+ (pico de color gris oscuro). Se observó que el Nanobody CD4 compitió hasta cierto grado con los Ac policlonales anti-CD4 usados para la activación, que puede haber dado como resultado una separación incompleta de las células CD4+ y CD4-. Para los Nanobodies monovalentes IL12Rβ1#30 e IL12Rβ2#1, se observaron bajas señales de fluorescencia para ambas células CD4+ y CD8+, lo que indica que los Nanobodies se unieron débilmente a ambos subconjuntos de células T. Los polipéptidos biespecíficos IL12Rβ1#30-CD4#8 e IL12Rβ2#1-CD4#8 mostraron una unión preferencial a la población de CD4+ con respecto al subconjunto de CD8+, lo que indica que estos Nanobodies otorgaron la especificidad del Nanobody CD4.

Ejemplo 3.4: Caracterización funcional de polipéptidos biespecíficos

Ejemplo 3.4.1. Bloqueo específico de células de la función de IL-12 en células T humanas

La capacidad de polipéptidos biespecíficos de captar simultáneamente ambas dianas en la misma célula se analizó en un ensayo funcional dependiente de IL-12, inhibición de la liberación de IFN-γ mediada por IL-12 en células T humanas activadas. Dado que el bloqueo funcional se media sólo a través de IL12R, se espera que la avidéz por la unión simultánea del Nanobody CD4 se traduzca en potencia aumentada del biespecífico en la inhibición de liberación de citocinas.

Se activaron células T humanas aisladas de capas leucocitarias durante cuatro días con Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco - Life Technologies #11131D) y un día con IL-2. Para diferenciarse en el subtipo Th1, las células T se cultivaron en presencia de IL-12 con coestimulación proporcionada por una placa recubierta con CD3 a 0,5 µg/ml (eBioscience #16-0037-85) y anti-CD28 (PeliCluster 1 µg/ml, Sanquin #M1650) en disolución. La concentración de ligando usada, 0,2 pM, se basó en experimentos de titulación de la dosis, usando una concentración <CE50. Como medición para la señalización dependiente de IL-12, se midió la liberación de la citocina Th1 típica IFN-γ tras 72 h en presencia o ausencia de los Nanobodies respectivamente mediante ELISA.

El bloqueo dependiente de la dosis de la liberación de IFN-γ mediada por IL-12 se evaluó para los polipéptidos

biespecíficos IL-12R β 2-CD4 e IL-12R β 1-CD4 en ambas orientaciones, y los Nanobodies monovalentes correspondientes. Los polipéptidos biespecíficos IL-23R-CD4 sirvieron como controles negativos. Los gráficos representativos de los polipéptidos biespecíficos IL12R β 1-CD4, IL12R β 2-CD4 e IL23R-CD4 se muestran en la figura 3.9, y los valores de CI50 en la tabla 3.2. Los cuatro polipéptidos biespecíficos IL12R β 2-CD4 mostraron un cambio en los valores de CI50 entre 74-1100 en comparación con su Nanobody monovalente IL12R β 2 respectivo (tabla 3.3), mientras que los polipéptidos biespecíficos CD4-IL23R no estaban bloqueándose. Además, se observaron diferencias de potencia de ~500 veces para los biespecíficos IL12R β 1-CD4. Aunque los constructos biespecíficos en ambas orientaciones muestran potenciaciones de potencia, el Nanobody IL12R β 2 en la posición N-terminal de CD4 proporcionó potenciaciones más fuertes. Todos estos datos muestran que los biespecíficos IL12R β 1-CD4 y los IL12R β 2-CD4 muestran una ganancia en potencia de 400-1000 en células T_{H1} que expresan ambos antígenos, y que la unión de CD4 por sí mismo no estaba interfiriendo.

Para verificar si esta funcionalidad selectiva de los polipéptidos biespecíficos en células T_{H1} se conservaba en las PBMC, en las que también estaban presentes otras células inmunitarias, se realizó el mismo ensayo usando PBMC humanas sanas activadas. Las células T dentro de la agrupación de PBMC se diferenciaron hacia el subtipo T_{H1} usando IL-12 0,1 pM. La liberación de IFN- γ en presencia o ausencia de los Nanobodies respectivamente se determinó mediante ELISA tras un periodo de incubación de 6 días. Un ejemplo representativo del bloqueo de IL12 de polipéptidos biespecíficos en PBMC se muestra en la figura 3.10. Además, en un ensayo basado en PBMC se observó una clara ganancia en potencia para cada uno de los biespecíficos IL12R β 1-CD4 y los IL12R β 2-CD4, con cambios en los valores de CI50 entre 10-50 veces con respecto a los Nanobodies monovalentes respectivos. Se sometieron a prueba PBMC de dos donantes distintos, con resultados similares. El Nanobody monovalente CD4 y los polipéptidos biespecíficos CD4-IL23R no tienen efecto, lo que indica que en el contexto de PBMC también se obtiene un bloqueo funcional selectivo por polipéptidos biespecíficos de una manera específica de subconjunto de células T.

Ejemplo 3.4.2. Bloqueo específico de células de la función de IL-23

Para verificar si los polipéptidos biespecíficos que seleccionan como diana el receptor de IL23 funcional mostraban afinidad y potencia aumentadas en células que expresan conjuntamente CD4 e IL23R, se midió la capacidad de los Nanobodies para inhibir la liberación dependiente de IL23 de la citocina IL17 tipo T_{H17}. En esta configuración de ensayo, se cultivaron PBMC humanas en presencia de IL23 soluble para permitir la diferenciación de células T hacia el fenotipo T_{H17}. Se sembraron las células sobre placas recubiertas OKT-3 (eBioscience #16-0037-85) en presencia de IL-23 humana recombinante (eBioscience #14-8239) y PeliCluster CD28 (Sanquin #M1650) en disolución. La liberación de citocina (IL17) en presencia o ausencia de los Nanobodies respectivamente se determinó mediante ELISA tras un periodo de incubación de 9 días.

Se evaluó la inhibición dependiente de la dosis del panel de polipéptidos biespecíficos IL23R-CD4 e IL12R β 1-CD4 en comparación con los Nanobodies monovalentes respectivos, sirviendo en este caso los polipéptidos específicos IL12R β 1-CD4 como controles negativos. La figura 3.11 muestra que los polipéptidos biespecíficos IL12R β 1-CD4 inhiben fuertemente la liberación de IL17 mediada por IL23 de una manera dependiente de la dosis, con potencias potenciadas entre 500-1700 veces con respecto a los Nanobodies monovalentes IL12R β 1 (tabla 3.3). Existe una preferencia para el bloque de construcción IL12R β 1 en la posición C-terminal del CD4 en este ensayo. Existe una clara diferencia en potencia entre los dos miembros de la familia IL12R β 1, correspondiente a las cinéticas de unión y afinidades diferentes, y esta diferencia se conserva en la potencia de los constructos biespecíficos. No se observa inhibición para los polipéptidos biespecíficos IL12R β 2-CD4, ni para el Nanobody anti-CD4, lo que indica que el bloqueo fue específico de subconjunto.

Para los constructos biespecíficos de IL23R y CD4, también existe una diferencia en potencia observada entre Nanobodies monovalentes y polipéptidos biespecíficos (figura 3.11, panel C), aunque los valores de CI50 no pueden determinarse para todos los Nanobodies. La diferencia en afinidad de los Nanobodies monovalentes se refleja en las potencias de los Nanobodies monovalentes en el ensayo funcional de IL23, pero esta diferencia no es tan clara para los constructos biespecíficos. Los Nanobodies IL23R no son miembros de la familia, y el epítipo del Nanobody IL23R#19 puede ser menos óptimo que IL23R#20 para la unión simultánea a CD4 en la membrana celular. Dado que el % de células T_{H17} obtenido con la agrupación de PBMC fue bastante bajo, una optimización adicional del protocolo de diferenciación de T_{H17} pudo corroborar adicionalmente las diferencias observadas. Además, las PBMC derivadas de pacientes que padecen enfermedad inflamatoria de T_{H17} típica, tal como psoriasis, pudieron proporcionar una mejor respuesta de IL23. Estas PBMC representan una mezcla fisiológica de subconjuntos de células T, con niveles de expresión de IL23R e IL12R esperados en un entorno de enfermedad de T_{H17} relevante.

Tomados juntos, estos resultados indican que los polipéptidos CD4-IL12R β 2 específicos del subconjunto T_{H1} y CD4-IL23R específicos del subconjunto T_{H17} muestran bloqueo funcional selectivo de una manera específica del subconjunto de células T, en ensayos con células T heterogéneas así como PBMC. Además, se mostró la unión selectiva de los polipéptidos biespecíficos a subconjuntos de células T CD4+, mientras que los Nanobodies monovalentes IL12R β 2 sólo mostraron una mala unión a células T CD4 y CD8.

Con respecto a las afinidades, incluso los Nanobodies de baja afinidad en el miembro funcional dieron potenciaciones de potencia de 2-3 logaritmos tras el formateo con un Nanobody CD4 de anclaje de alta afinidad.

5 Tabla 3.1: características de Nanobodies monovalentes específicos de IL-12Rb2, IL-12Rb2 e IL-23R.

ID de Nanobody	Cinética de unión (SPR)			Inhibición de unión a ligando (ELISA)	Unión de células T (FACS)
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	CI_{50} (M)	CE_{50} (M)
IL12Rb2#1:135B08	2,1E+05	5,7E-04	2,7E-09	4,2E-09	1,5E-09
IL12Rb2#2:135A07	2,7E+05	1,8E-03	6,9E-09	1,5E-08	1,8E-09
IL12Rb1#30:148C09	4,5E+05	1,5E-03	3,3E-09	3,7E-09 (IL-12), 1,5E-9 (IL-23)	1,3E-09
IL12Rb1#31:148F09	7,2E+05	1,7E-02	2,3E-08	2,2E-08 (IL-12), 1,0E-8 (IL-23)	<i>sin ajuste</i>
IL23R#19:150D02	7,3E+05	8,1E-03	1,1E-08	4,7E-09	2E-08
IL23R#20:150H07	3,0E+06	2,3E-01	7,8E-08	1,6E-08	<i>sin ajuste</i>

Tabla 3.2: inhibición de la función de IL-12 por panel de Nanobodies monovalentes y biespecíficos IL12Rb1-CD4, IL12Rb2-CD4 e IL23RCD4.

10

ID de Nanobody	Nb1	Nb2	Inhibición de IL-12					
			CI50 de ELISA de comp. (M)	cambio en veces	CI50 de células T D839 de liberación de IFN γ (M)	cambio en veces	CI50 de PBMC D840 de liberación de IFN γ (M)	cambio en veces
CD4#8			-		-		-	
IL23R#19			-					
BI#42	IL23R#19	CD4#8						
BI#45	CD4#8	IL23R#19	-					
IL23R#20			-					
BI#43	IL23R#20	CD4#8	-		-		-	
BI#44	CD4#8	IL23R#20	-		-		-	
IL12Rb1#30			3,70E-09		1,40E-07		1,70E-08	
BI#46	IL12Rb1#30	CD4#8	6,20E-09	0,6	2,9E-10	552	4,5E-10	38
BI#40	CD4#8	IL12Rb1#30	7,30E-09	0,5	2,8E-10	429	3,6E-10	47
IL12Rb1#31			2,20E-08		<i>sin ajuste</i>		9,35E-08	
BI#47	IL12Rb1#31	CD4#8	2,40E-08	0,9	4,1E-09		1,9E-09	41
BI#41	CD4#8	IL12Rb1#31	2,80E-08	0,8	1,7E-09		2,2E-09	50
IL12Rb2#1			4,20E-09		5,10E-08		1,35E-08	
BI#37	IL12Rb2#1	CD4#8	4,80E-09	0,9	1,10E-10	400	1,1E-09	11
BI#39	CD4#8	IL12Rb2#1	1,00E-08	0,4	7,8E-10	74	1,9E-09	8
IL12Rb2#2			1,50E-08		6,70E-08		4,00E-08	
BI#36	IL12Rb2#2	CD4#8	1,10E-08	1,4	3,1E-11	1129	1,6E-09	30
BI#38	CD4#8	IL12Rb2#2	2,50E-08	0,6	7,6E-10	130	2,1E-09	8

Tabla 3.3: inhibición de la función de IL-23 por panel de Nanobodies monovalentes y biespecíficos IL23R-CD4, IL12Rb1-CD4 e IL12Rb2-CD4.

ID de Nanobody	Nb1	Nb2	Inhibición de IL-23			
			CI50 de ELISA de comp. De IL-23 (M)	cambio en veces	CI50 de PBMC D840 de liberación de IL-17 (M)	cambio en veces
CD4#8			-		-	
IL23R#19			1,70E-09		1,00E-07	
BI#42	IL23R#19	CD4#8	6,10E-09	0,3	5,89E-08	1,7
BI#45	CD4#8	IL23R#19	6,60E-09	0,3	2,42E-08	4,1

IL23R#20			1,60E-08		sin ajuste	
BI#43	IL23R#20	CD4#8	1,10E-08	1,5	sin ajuste	
BI#44	CD4#8	IL23R#20	1,50E-08	1,1	2,20E-08	
IL12Rb1#30			1,50E-09		3,55E-08	
BI#46	IL12Rb1#30	CD4#8	3,00E-09	0,5	1,6E-11	875
BI#40	CD4#8	IL12Rb1#30	3,60E-09	0,4	3,5E-11	1629
IL12Rb1#31			1,00E-08		2,10E-07	
BI#47	IL12Rb1#31	CD4#8	1,30E-08	0,8	2,3E-10	565
BI#41	CD4#8	IL12Rb1#31	1,50E-08	0,7	1,7E-10	1706
IL12Rb2#1						
BI#37	IL12Rb2#1	CD4#8				
BI#39	CD4#8	IL12Rb2#1				
IL12Rb2#2						
BI#36	IL12Rb2#2	CD4#8	-		-	
BI#38	CD4#8	IL12Rb2#2	-		-	

Ejemplo 4: Polipéptidos biespecíficos EGFR-CEA

Ejemplo 4.1: Características de Nanobodies monovalentes usados para el formateo

Los ejemplos anteriores indicaron que puede medirse la avidéz específica de células de polipéptidos biespecíficos mediante un aumento de potencia en ensayos funcionales, en los que los polipéptidos biespecíficos bloquearán la función del receptor específicamente en células cuando pueden participar simultáneamente ambas dianas *en cis*. Para demostrar la ventana terapéutica, se realizaron ensayos celulares funcionales en células que expresan conjuntamente las dos dianas (“células doblemente positivas”), y células que sólo expresan la diana funcional (“células positivas únicas”) que representan células normales.

Los ejemplos anteriores también indicaron que para el bloqueo específico de células se necesitan Nanobodies funcionales monovalentes con afinidades y potencias bajas, para garantizar que los Nanobodies monoespecíficos no son suficientemente potentes en células normales. Para obtener selectividad, se necesitaron afinidades muy bajas, en las que el biespecífico simplemente se asemeja al anclaje, lo que indica que existe una delicada compensación entre selectividad y potencia funcional suficiente. En el ejemplo actual, se abordó adicionalmente el efecto de la afinidad para Nanobodies en el brazo funcional, para determinar si existe una afinidad umbral para el bloqueo selectivo. El receptor de tirosina cinasa EGFR se usa como antígeno modelo en el brazo funcional, para el que la proteína recombinante está disponible para permitir la determinación precisa de las afinidades y los parámetros cinéticos mediante SPR.

La segunda diana, el antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CEACAM5), es un antígeno específico de tumor bien conocido expresado en muchos tipos de tumor. El CEA es una glicoproteína de la superficie celular anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que desempeña un papel en la adhesión celular. Es un marcador asociado a tumor establecido para cánceres del tracto gastrointestinal y encontrado también en cánceres de mama y de pulmón. La expresión conjunta de EGFR y CEA se ha notificado para los cánceres gástrico y colorrectal, en tumores primarios y en metástasis peritoneal, con mayor expresión en membrana de CEA que EGFR en la mayoría de los casos (Ito *et al.* 2013, Tiernan *et al.* 2013). Esto hace a CEA una diana útil para servir como anclaje para combinarse con EGFR para el bloqueo funcional de una manera selectiva de tumor.

Los Nanobodies de bloqueo de ligandos contra EGFR se generaron previamente de manera interna y se describen bien por Roovers *et al.* (2011). El Nanobody 7D12 se une al sitio de unión de ligando en el dominio III del dominio extracelular de EGFR, superponiéndose con el epítipo de cetuximab. La afinidad notificada de 7D12 radiomarcado con [¹²⁵I] fue de 10,4 y 25,7 nM para células HER14 y A431, respectivamente. Su miembro de la familia 7C12 difiere en 5 residuos de aminoácido.

Para evaluar el efecto de la afinidad mientras se garantizaba que se conservaba el epítipo en EGFR, se generó un panel de EGFR 7D12 y variantes de 7C12 con afinidades reducidas para su uso en el formateo. Basándose en la estructura de cocristal del Nanobody 7D12 con el ectodominio de EGFR (Schmitz *et al.*, 2013), se sustituyeron aminoácidos en la superficie de contacto del receptor en 7D12 con residuos que se esperaba que redujeran las velocidades de disociación de una manera gradual (tabla 4.1).

En el brazo de anclaje, se usó un Nanobody específico de CEACAM5 denominado NbCEA5 con una alta afinidad notificada de K_D 0,3 nM por Cortez-Ramiras *et al.* (2004). Se ha descrito una variante de este Nanobody con una reducción de 30 veces en su afinidad debido a la introducción de las regiones CDR en un armazón proteínico humano (Vaneycken *et al.*, 2011). Ambos Nanobodies así como las variantes de CEA adicionales se generaron con varias sustituciones de aminoácido, para reducir la afinidad pero salvaguardar una expresión de Nanobody suficientemente alta (tabla 4.2).

El panel de variantes de NbCEA5 y variantes de EGFR 7D12 monovalentes con afinidades disminuidas se caracterizó con respecto a la cinética de unión, y la unión a receptores expresados en células.

5 Ejemplo 4.1.1. SPR

Para determinar las afinidades de unión precisas de las variantes de EGFR purificadas, se realizó un análisis cinético de múltiples ciclos usando análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore T100) en el dominio extracelular de hEGFR directamente inmovilizado (Sino Biological, #10001-H08H). Se inmovilizaron alrededor de 1000 RU de hEGFR en un chip sensor CM5. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+ (GE Healthcare, BR-1006-69) a 25°C, con una velocidad de flujo de 5 µl/min. Para la inmovilización por el acoplamiento de aminos, se usó EDC/NHS para la activación y clorhidrato de etanolamina para la desactivación (Biacore, kit de acoplamiento de aminos). Los Nanobodies se evaluaron a un intervalo de concentración de entre 1,37 nM y 3 µM. Se dejaron asociar los Nanobodies durante 2 min y disociar durante 15 min a una velocidad de flujo de 45 µl/min. Entre inyecciones, se regeneraron las superficies con un pulso de 5 s de NaOH 50 mM y un periodo de estabilización de 1 min. La evaluación de los datos de asociación/disociación se realizó ajustando a un modelo de interacción 1:1 (modelo de unión de Langmuir) mediante el software Biacore T100 v2.0.3. Las interacciones que no cumplían los criterios de aceptación para el modelo de interacción 1:1 se ajustaron usando el modelo de ajuste de ligando heterogéneo. Se calculó la constante de afinidad K_D a partir de las constantes de velocidad de asociación y disociación k_a y k_d resultantes, y se muestran en la tabla 4.1. La introducción de sustituciones de aminoácido definidas redujo claramente la velocidad de disociación del Nanobody EGFR, mientras que las velocidades de asociación fueron similares.

Las afinidades de unión de los Nanobodies CEA purificados se obtuvieron usando condiciones experimentales similares en hCEACAM-5 directamente inmovilizado (R&D Systems, #4128-CM) hasta 1000 RU en un chip sensor CM5. Entre inyecciones, se regeneraron las superficies con un pulso de 5 s de clorhidrato de glicina 10 mM pH 1,5 y un periodo de estabilización de 1 min. La evaluación de los datos de asociación/disociación se realizó ajustando a un modelo de interacción 1:1 (modelo de unión de Langmuir) mediante el software Biacore T100 v2.0.3. Se calculó la constante de afinidad K_D a partir de las constantes de velocidad de asociación y disociación k_a y k_d resultantes, y se muestran en la tabla 4.2. La afinidad observada del Nanobody NbCEA5 (denominado CEA#1) y la variante humanizada (CEA#2) estaban en línea con el valor notificado.

Ejemplo 4.1.2. Unión a proteínas recombinantes EGFR y CEACAM5 en ELISA

Se demostró que todos los Nanobodies purificados se unían al ectodominio de EGFR recombinante y a la proteína CEACAM5 recombinante de una manera dependiente de la dosis en ELISA de unión. En resumen, se recubrieron 0,25 µg/ml de EGFR ECD humano (Sino Biological, n.º de cat.10001-H08H) o 0,125 µg/ml de CEACAM5 humano recombinante (R&D Systems, Cat #4128-CM) directamente en placas de microtitulación SpectraPlate-HB de 384 pocillos (Perkin Elmer). Se bloquearon los sitios de unión libres con caseína al 1% en PBS. Se permitieron diluciones en serie de Nanobodies purificados para unir el antígeno durante 1 hora. La unión del Nanobody se detectó usando anticuerpo anti-FLAG M2 de ratón conjugado con HRP (Sigma, n.º de cat. A8592) y una reacción enzimática posterior en presencia del sustrato esTMB (SDT reagents, n.º de cat. esTMB). La especificidad de unión se determinó basándose en los valores de D.O. en comparación con controles de Nanobody irrelevantes. Los valores de CE50 se muestran en las tablas 4.1 y 4.2.

Ejemplo 4.1.3. Unión de FACS

Las líneas celulares de carcinoma de colon LoVo y HT-29 expresan conjuntamente EGFR y CEA con diferentes niveles de expresión relativos (figura 4.1). Dado que las células LoVo tuvieron mayores niveles de CEA en comparación con HT-29, se usaron células LoVo para el análisis de unión del panel de variantes de EGFR y CEA monovalentes a los receptores expresados en células. La unión a EGFR y CEA expresados en células se confirmó mediante citometría de flujo en células LoVo EGFR+/CEA+, y para células HER14, células NIH-3T3 murinas que expresan de manera estable EGFR humano. El Nanobody unido se detectó a través de un anticuerpo específico de etiqueta flag, tal como se describe. Los resultados se muestran en la figura 4.1. Para las variantes de EGFR, no se logró la saturación, por tanto, no pudo determinarse la CE50 precisa, pero las diferencias en velocidades de disociación fueron visibles en curvas desplazadas. La especificidad de Nanobodies CEA se confirmó por la falta de unión a células HER14 (datos no mostrados).

Las características de unión de las variantes de CEA y las variantes de EGFR 7D12 monovalentes se presentan en las tablas 4.1 y 4.2, respectivamente. Para la generación de Nanobodies biespecíficos EGFR-CEA, se seleccionaron cuatro variantes de EGFR con diferencias en velocidades de disociación que dieron como resultado una disminución gradual de los valores de K_D (que oscilaron entre 120-860 nM). La diferencia en la velocidad de disociación entre la variante de EGFR de más alta y más baja afinidad fue de 8 veces. Cuando se midió en ELISA, la diferencia se aumentó hasta ~80 veces, debido a la disociación de los Nanobodies con las velocidades de disociación rápidas durante el lavado. En comparación con la variante de más alta afinidad EGFR#1, la variante EGFR#11 tiene dos

sustituciones de aminoácido, mientras que EGFR#33 y EGFR#32 tienen tres diferencias de aminoácido. Para el brazo de anclaje, además del Nanobody CEA original (CEA#1), también se seleccionó la variante CEA#5 para su uso en el formateo, con cuatro sustituciones de aminoácido, ya que este Nanobody tuvo la diferencia más grande en la velocidad de disociación en comparación con el Nanobody original.

5

Tabla 4.1: características de unión de Nanobodies monovalentes EGFR usados para el formateo

Nanobody		hEGFR ECD			ELISA hEGFR	EGFerbB-1-PY en Her-14
ID	Descripción	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	CE50 (M)	CI50 (M)
EGFR#1	7C12(A1E,A14T,T98A,Q108L)	2,1E+05	2,4E-02	1,2E-07	7,1E-10	7,9E-08
EGFR#10	7C12(Q108L)	4,1E+05*	1,7E-02*	4,1E-08		
EGFR#11	7C12(A1E,Q108L)	2,2E+05	3,7E-02	1,7E-07	3,3E-09	7,1E-08
EGFR#12	7C12(E100fS,Q108L)	1,9E+05	8,0E-02	4,3E-07		
EGFR#13	7C12(Y102A,Q108L)	3,4E+05*	8,6E-01*	2,5E-06*		
EGFR#16	7C12(R27S,Q108L)	2,4E+05	2,1E-02	9,0E-08		
EGFR#33	7C12(A1E,R27S,Q108L)	2,2E+05	5,4E-02	2,4E-07	4,5E-09	2,4E-07
EGFR#32	7C12(A1E,E100fS,Q108L)	2,7E+05	2,3E-01	8,6E-07	5,8E-08	1,4E-06

*Valores indicativos

10 Tabla 4.2: Características de Nanobodies monovalentes CEACAM5 usados para el formateo

ID de Nanobody	Descripción	hCEACAM5			ELISA CEACAM5	FACS LoVo
		K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	CE50 (M)	CE ₅₀ (M)
CEA#1	NbCEA5	9,9E+05	5,1E-04	5,1E-10	2,6E-11	1,0E-09
CEA#2	NbCEA5(S11L,A14P,K43Q,E44G,R45L,G47A,T73,A74S,V78L,P84A,D85E,D89V)	1,3E+06	2,5E-03	1,9E-09		
CEA#5	NbCEA5(K43Q,G47A,T73N,V78L)	1,1E+06	3,3E-03	3,1E-09	1,1E-10	2,4E-09

Ejemplo 4.2: Generación de polipéptidos biespecíficos

15 El formateo de polipéptidos biespecíficos EGFR-CEA se logró mediante fusión genética de Nanobodies ligados con un ligador 35GS flexible, con ambos bloques de construcción en ambas orientaciones. Se combinaron cuatro variantes de EGFR diferentes con distintas velocidades de disociación con dos Nanobodies CEA distintos con valores de K_D de 0,5 y 3 nM, respectivamente (figura 4.2). Además, se construyó cada Nanobody con un Nanobody de control irrelevante (cAbls3, dirigido a lisozima), para conservar la valencia en las moléculas monoespecíficas de referencia. La secuencia de nucleótidos correcta de todos los constructos se confirmó mediante análisis de secuencia (véase la tabla 11 para una visión general de todas las secuencias). Todos los polipéptidos se generaron como proteínas etiquetadas con flag₃-His₆ en la levadura *Pichia pastoris*. La purificación se realizó usando cromatografía de afinidad convencional.

25 Ejemplo 4.3: Análisis de unión de Nanobodies biespecíficos EGFR-CEA

Ejemplo 4.3.1. Efecto del formateo

30 Para verificar si el formateo afectaba a la capacidad de cada uno de los bloques de construcción para unirse a su diana respectiva, se evaluó la unión de los Nanobodies biespecíficos purificados por medio de ELISA de unión en el ectodominio de EGFR recombinante o CEACAM5, tal como se describió anteriormente. Los valores de CE50 de todos los Nanobodies monoespecíficos y polipéptidos biespecíficos que comprenden EGFR-CEA se muestran en la tabla 4.3.

35 Para todos los biespecíficos EGFR-CEA, el Nanobody CEA mantuvo una unión similar a la del Nanobody monovalente respectivo. Por el contrario, los Nanobodies EGFR fueron sensibles a la posición dentro del constructo biespecífico, y solo se conserva la interacción con EGFR en la posición N-terminal (figura 4.3). Para estos constructos, las afinidades aparentes medidas siguen las diferencias de afinidad observadas para los Nanobodies monovalentes. Cuando EGFR se posicionó en el extremo C-terminal del Nanobody CEA, se midió una afinidad de unión ~30 veces menor. Se notificó previamente una sensibilidad a la orientación similar para 7D12 de tipo natural formateado con un Nanobody EGFR distinto dirigido contra un epítipo diferente (Roovers *et al.* 2011).

40 Ejemplo 4.3.2. Especificidad de unión

Las especificidades de unión de los constructos de Nanobody mono-específicos y bio-específicos EGFR-CEA se analizaron mediante citometría de flujo en células HER14 y HeLa EGFR+/CEA-, y células LoVo y HT-29 doblemente positivas, respectivamente. Los valores de CE50 se presentan en la tabla 4.3. Los resultados para células LoVo se muestran en la figura 4.4.

Los polipéptidos bio-específicos se unieron eficazmente a las células de una manera dependiente de la dosis. En línea con los datos de ELISA, los polipéptidos bio-específicos con el Nanobody EGFR#1 en posición C-terminal perdieron una afinidad de unión sustancial tanto en células HER14 como en LoVo. Cuando se comparan Nanobodies mono-específicos EGFR, las diferencias en velocidades de disociación entre las distintas variantes de EGFR son menos pronunciadas en EGFR expresado en células, especialmente cuando los niveles de expresión de EGFR no son demasiado altos, tal como en células LoVo y HeLa (figura 4.5). En estas células, los constructos de las 3 variantes de EGFR con las afinidades más altas tuvieron todos valores de CE50 muy similares entre 2,5-5,5 nM (tabla 4.3).

En células LoVo, los polipéptidos bio-específicos en la orientación EGFR-CEA mostraron niveles de fluorescencia aumentados y un ligero cambio en los valores de CE50 en comparación con los Nanobodies EGFR de control respectivos (figura 4.4, paneles A, B, C), excepto para los bio-específicos de EGFR#32 con la afinidad más baja para EGFR. En este caso, los constructos bio-específicos mostraron una unión prácticamente idéntica a los Nanobodies de control CEA#1 o CEA#5 de anclaje respectivos, lo que indica que no existe una contribución en el brazo EGFR (figura 4.4, panel D). Esto confirma los resultados previos obtenidos con polipéptidos bio-específicos CXCR4-CD4 y CXCR4-IL3Ra, en los que el aumento en la señal de fluorescencia sólo se observa cuando existe una unión suficiente a cada una de las dianas.

Tabla 4.3: análisis de unión de Nanobodies mono-específicos y bio-específicos EGFR-CEA.

ID	Descripción	EGFR ELISA	CEA ELISA	Her-14 EGFR+/CEA-	HeLa EGFR+/CEA-	LoVo EGFR+/CEA+
		CE50 (M)	CE50 (M)	CE50 (M)	CE50 (M)	CE50 (M)
BI#52	EGFR#1-ctrl	1,30E-09	-	8,6E-09	3,9E-09	4,3E-09
BI#26	EGFR#1-CEA#1	6,70E-10	4,90E-11	7,5E-09	1,9E-09	1,5E-09
BI#27	EGFR#1-CEA#5	3,50E-10	1,20E-10	2,0E-09	2,1E-09	3,4E-09
BI#28	CEA#1-EGFR#1	2,30E-08	5,60E-11	3,4E-08	2,4E-07	1,1E-09
BI#29	CEA#5-EGFR#1	1,30E-08	1,00E-10	3,6E-08	1,3E-07	3,0E-09
BI#49	EGFR#11-ctrl	1,70E-09	-	9,1E-09	2,9E-09	5,0E-09
BI#22	EGFR#11-CEA#1	9,35E-10	4,70E-11	7,1E-09	2,5E-09	1,5E-09
BI#24	EGFR#11-CEA#5	8,30E-10	1,40E-10	4,3E-09	3,6E-09	3,8E-09
BI#53	EGFR#33-ctrl	4,00E-09	-	1,7E-08	3,5E-09	4,5E-09
BI#34	EGFR#33-CEA#1	1,30E-09	5,30E-11	1,1E-08	2,7E-08	2,1E-09
BI#35	EGFR#33-CEA#5	6,10E-10	8,90E-11	3,6E-09	4,0E-09	3,7E-09
BI#50	EGFR#32-ctrl	1,60E-08	-	2,0E-08	5,7E-08	5,6E-08
BI#23	EGFR#32-CEA#1	1,10E-08	4,60E-11	1,4E-08	7,8E-08	1,8E-09
BI#25	EGFR#32-CEA#5	6,00E-09	1,20E-10	1,5E-08	1,1E-07	4,9E-09
BI#48	CEA#1-ctrl	-	2,60E-11	-	-	9,2E-10
BI#51	CEA#5-ctrl	-	1,10E-10	-	-	2,6E-09

Ejemplo 4.4: Inhibición de la función de EGFR mediante polipéptidos bio-específicos EGFR-CEA

Para verificar si los polipéptidos bio-específicos podían potenciar la potencia de los Nanobodies EGFR mediante la participación simultánea de EGFR y CEA en la superficie celular, se analizó el panel de polipéptidos bio-específicos EGFR-CEA y los Nanobodies mono-específicos correspondientes en un ensayo de EGFR funcional.

Se evaluó la inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de EGFR en células HER14 que sólo expresan EGFR, y células LoVo EGFR+/CEA+. Dado que la fosforilación funcional sólo está mediada a través de EGFR, se espera que la afección por la unión simultánea del Nanobody CEA se traduzca en una inhibición aumentada de la fosforilación de EGFR de una manera específica de células.

En resumen, se sembraron células LoVo por duplicado en placas de cultivo de 96 pocillos a 2×10^4 células por pocillo en medio F12-K complementado con FCS al 10%. Se sembraron células HER14 por duplicado en placas de cultivo de 96 pocillos recubiertas con gelatina al 0,1% y se hicieron crecer en medio de cultivo DMEM que contenía FBS/BS al 10% durante 24 h. Al día siguiente, se privaron de suero las células en medio complementado con FCS al 0,1% durante 24 h y luego se incubaron con Nanobodies seguido por estimulación durante 10 minutos con 0,5 nM de EGF humano recombinante (R&D Systems, n.º de cat. 236-EG) para HER14 y 1 nM para células LoVo. Las concentraciones de EGF se basaron en la CE50 obtenida en células LoVo (CE50 = 5,9 ng/ml) y HER14 (CE50 = 3,5 ng/ml). En cada placa se incluyeron AcM anti-EGFR cetuximab (Erbix Merck-Serono) y Nanobodies de control irrelevantes como referencia. Se enjuagaron las monocapas dos veces con dPBS enfriado con hielo, y

posteriormente se lisaron en tampón RIPA enfriado con hielo sustituido con PMSF 1 mM. La activación del receptor dependiente de EGF en lisados celulares se midió usando un kit de lisado celular completo Fosfo(Tyr1173)/Total EGFR (Meso Scale Discovery - K15104D). Se cargaron las placas con 30 µl de lisado, se incubaron 1 h a TA con agitación y se procesaron según el protocolo del fabricante. Se leyeron las placas en el dispositivo Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Se calculó el porcentaje de fosfoproteína con respecto a la proteína total usando la fórmula: $(2 \times \text{fosfoproteína}) / (\text{fosfoproteína} + \text{proteína total}) \times 100$.

Los gráficos representativos se muestran en la figura 4.6, y los valores de CI50 promedio de dos y tres ensayos independientes se enumeran en la tabla 4.4. Los Nanobodies muestran una inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de EGFR en ambas células. En células HER14, todos los polipéptidos biespecíficos EGFR-CEA mostraron una misma inhibición de la fosforilación de EGFR que los controles monoespecíficos correspondientes. Las diferencias de potencia medidas entre los controles monoespecíficos EGFR siguen las velocidades de disociación de los bloques de construcción monovalentes EGFR, con valores de CI50 de 65-52-150-690 nM (HER14) y 75-150-467-2333 nM (LoVo), respectivamente.

En células LoVo EGFR+/CEA+, se observó una diferencia en potencia de aproximadamente 5 veces entre los polipéptidos monoespecíficos y biespecíficos EGFRCEA para los constructos con EGFR#1 y EGFR#33 combinados con el Nanobody CEA#1 como anclaje. Los constructos con la variante de afinidad más baja EGFR#32 no pudieron bloquear la función de EGFR, y la presencia adicional de Nanobody CEA no pudo potenciar su potencia.

Tomados juntos, estos resultados muestran que se obtuvieron potenciaciones de potencia con polipéptidos biespecíficos para la combinación de dianas EGFR y CEACAM5, exclusivamente en células que expresan conjuntamente ambos receptores. El pequeño aumento de potencia relativa de polipéptidos biespecíficos EGFR-CEA observado en células LoVo en el ensayo de fosforilación puede relacionarse con una razón subóptima entre la expresión de CEA y EGFR en estas células, pero también es posible que los efectos de potencia sean mayores en ensayos que miden respuestas funcionales de EGF, tales como proliferación y supervivencia. Además del efecto en la fosforilación del receptor en un punto de tiempo, tal como se evalúa en el ensayo actual, el Nanobody podía tener efectos diferenciales sobre la inactivación del receptor y la cinética de degradación, que no se evalúan en un ensayo de transducción de señales. También es posible que los Nanobodies seleccionados para este ejemplo tuvieran limitaciones estéricas con respecto al epítipo en la diana, que puede restringir la participación simultánea de ambas dianas en la superficie celular.

Se observó una ganancia en potencia para la combinación actual sometida a prueba, pero los polipéptidos biespecíficos EGFR-CEA dirigidos hacia otros epítipos pueden mostrar potenciaciones de potencia específicas de células mayores.

Tabla 4.4: inhibición de fosforilación de EGFR mediada por EGF mediante Nanobodies biespecíficos EGFR-CEA en comparación con Nanobodies monoespecíficos de control.

ID	Descripción	HER-14 (n=2) EGFR+/CEA-		LoVo (n=2-3) EGFR+/CEA+	
		CI50 (M)	aumento en veces*	CI50 (M)	aumento en veces
BI#52	EGFR#1-ctrl	6,55E-08		7,53E-08	
BI#26	EGFR#1-CEA#1	5,80E-08	1,1	1,50E-08	5,0
BI#27	EGFR#1-CEA#5	3,65E-08	1,8	2,50E-08	3,0
BI#28	CEA#1-EGFR#1	1,75E-06		4,83E-06	
BI#29	CEA#5-EGFR#1	1,95E-06		3,10E-06	
BI#49	EGFR#11-ctrl	5,25E-08		1,50E-07	
BI#22	EGFR#11-CEA#1	6,25E-08	0,8	4,30E-08	3,5
BI#24	EGFR#11-CEA#5	5,00E-08	1,1	4,15E-08	3,6
BI#53	EGFR#33-ctrl	1,50E-07		4,63E-07	
BI#34	EGFR#33-CEA#1	6,05E-08	2,5	5,98E-08	7,7
BI#35	EGFR#33-CEA#5	1,23E-07	1,2	8,90E-08	5,2
BI#50	EGFR#32-ctrl	6,90E-07		2,85E-06	
BI#23	EGFR#32-CEA#1	1,50E-06	0,7	8,85E-07	3,2
BI#25	EGFR#32-CEA#5	8,10E-07	1,3	8,08E-07	3,5
BI#48	CEA#1-ctrl	-		-	
	erbitux	1,25E-09		4,4E-10	

*Razón de CI50 con respecto a Nanobodies monoespecíficos EGFR respectivos en la misma línea celular.

Tabla 1: bloques de construcción de CXCR4

14D09		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSKRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGN KDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYW GQGTQVTVSS
14A09		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSIRNSGWYRQAPGKQRESVATISSGGN KDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYW GQGTQVTVSS
281F12 (Q108L)		EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPGKEREVFAAIGWGPS KTNADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEM YTYWGQGTTLVTVSS
14A02		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSIRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGN KDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYW GQGTQVTVSS
14E02		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSIRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGN KDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYW GQGTQVTVSS
14D09 (Q108L)		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSKRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGN KDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYW GQGTTLVTVSS
281F12 (TAG)	4CXCR281F1 2-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPGKEREVFAAIGWGPS KTNADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEM YTYWGQGTTLVTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHH
14D09 (TAG)	4CXCR014D0 9-FLAG3-HIS6	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSKRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGN KDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYW GQGTTLVTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHH

5

Tabla 2: bloques de construcción de CD123

55B04		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGINFRFNSMGWRRRAPGKEREWVAAITSGD ITNYRDSVRGRFTISRDNVKNVTYVLQMNTLKLKEDTAVYYCNTFPPIADYWGLGTQV TVSS
51D09		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSGNTMGWYRQAPGKQRELVAAITSSGGS TDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAAILLRYLYGYEEGDY WGLGTLVTVSS
55C05		EVQLVESGGGLVPAGDSLRLSCVASGRSLNTYTMGWFRQAPGKECFVAAINWNGV YRDYADSAKGRFTASRDNAMNTVFLQMNSLKPEDTAVYFCATATQGWRHTEPSDF GSWGLGTQVTVSS
50F07		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSGSTFSINAMGWYRQAPGKQRELVAAITSGGR TNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNARISAGTAFWLWSDYE YWGLGTLVTVSS
55F03		EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRFTSSYVMGWFRQAPGKEREVFAAIYWSNG KTQYTDVSKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETFRTLP IAY DYWGLGTQVTVSS
55A01		EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTTSGRALNMYVMGWFRQAPGNEREVFAATSSSGG STSYPDVSKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAAAYRCAASPYVSTPTMNI LEE YRYWGLGTQVTVSS
57A07		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSGNVMGWYRRQAPGKEREWVAAIASGG SIYYRDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSHPPTLPYWGLGTQV TVSS

Tabla 3: características de Nanobodies IL-3Ra monovalentes

Nanobody		SPR-IL-3Ra				Unión de FACS			Competición de AcM 7G3
	ID	Línea germinal	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D [M]	CE50 de MOLM-13 (M)	CE50 de THP-1 (M)	CE50 de Hek-ILR3a (M)	CI50 (M)
CD123#1	57A07	VHH2	1,0E+06	8,1E-04	7,83E-10	6,6E-10	1,3E-9	2,4E-10	1,20E-09
CD123#2	55A01	VHH3	8,4E+04	1,4E-03	1,71E-08	8,2E-9	1,1E-8	1,10E-09	4,00E-08
	55B04	VHH2	5,04E+05	7,94E-03	1,58E-08	5,12E-08			5,50E-08
	51D09	VHH2	3,78E+04	5,16E-04	1,36E-08	1,53E-08			
	55C05	VHH3	1,26E+05	7,41E-03	5,90E-08	3,12E-08			1,90E-07
	50F07	VHH2	1,02E+05	7,58E-03	7,42E-08	1,46E-08			2,30E-07
	55F03	VHH3	4,25E+04	4,87E-03	1,15E-07	1,13E-07			

Tabla 4: características de Nanobodies CXCR4 monovalentes

Nanobody		Competición de ligandos				Unión de CXCR4		
Descripción	ID	Fam.	CI50 de biotina-SDF-1 (nM)	Ki de [¹²⁵ I]-SDF-1# (nM)	CI50 de Jurkat por quimiotaxia (nM)	CE50 de Caki-CXCR4 (nM)	CE50 de Jurkat (nM)	CE50 de CXCR4-VLP (nM)
CXCR4#2	281F12	3		26,9	68	nd	7,8	nd
CXCR4#1	14D09	57	18,4		11	9,9	11	7,28
	14A02	57	4,1		0,95	4,0	1,15	0,73
	14E02	57	13,5			2,6	nd	0,78
	238D4	17	2,1	5,4	7,6	3,4	nd	nd

Determinada con [¹²⁵I]-SDF-1 en extractos de membrana de células Hek-CXCR4.

Tabla 5: resumen de Nanobodies seleccionados

Función de Nanobody	Diana	Afinidad alta: $K_D \leq 1$ nM $CE_{50} \leq 1$ nM	Afinidad media: CE_{50}/K_D $1 < x \leq 10$ nM Inhibición de ligandos CI_{50} $1 < x < 10$ nM	Inhibición de ligandos de potencia media/baja $CI_{50} \geq 10$ nM
Funcional	CXCR4		CXCR4#1: 14D09	CXCR4#2: 281F12
Anclaje	CD123	CD123#1: 57A07	CD123#2: 55A01	
Anclaje	CD4	CD4#8: 3F11		
Funcional	IL12R β 1		IL12R β 1#30: 148C09	IL12R β 1#31: 148F09
Funcional	IL12R β 2		IL12R β 2#1: 135B08	IL12R β 2#2: 135A07
Funcional	IL-23R		IL23R#19: 150D02	IL23R#20: 150H07
Funcional	EGFR			EGFR#1/11/33/32: variantes de 7D12
Anclaje	CEACAM5	CEA#1: NbCEA5	CEA#5: variante de NbCEA5	

5 Tabla 9

Función de Nanobody	Diana	Afinidad alta: $K_D \leq 1$ nM $CE_{50} \leq 1$ nM	Afinidad media: CE_{50} $1 < x \leq 10$ nM
Anclaje	CD123	CD123#1: 57A07	CD123#2: 55A01
Anclaje	CD4	CD4#8: 3F11	
Anclaje	CEACAM5	CEA#1: NbCEA5	CEA#5: variante de NbCEA5

Tabla 6: resumen de constructos biespecíficos

57A07 - 14D09	55A01 - 14D09
57A07 - 281F12	55A01 - 281F12
14D09 - 57A07	14D09 - 55A01
281F12 - 57A07	281F12 - 55A01

10

Tabla 7: constructos biespecíficos (todos con etiqueta c-myc HIS6)

57A07 - 14D09	A0110057A0 7-35GS-4CXCR014D09(Q108L)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FSGNVMGWYRRQAPGKEREWVAAIASGGSIYYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSHPPTLPYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSISSSKRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGNKDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYWGQGTLLVTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH
57A07 - 281F12	A0110057A0 7-35GS-4CXCR281F12(Q108L)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FSGNVMGWYRRQAPGKEREWVAAIASGGSIYYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSHPPTLPYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAIGWGPSKNTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTLLVTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH
14D09 - 57A07	4CXCR014D09(Q108L)-35GS-A0110057A07-	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSISSSKRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGNKDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATRGRGYTYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FSGNVMGWYRRQAPGKEREWVAAIASGGSIYYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSHPPTLPYWGQGTLLVTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH
281F12 - 57A07	4CXCR281F12(Q108L)-35GS-A0110057A07-	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAIGWGPSKNTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSI FSGNVMGWYRRQAPGKEREWVAAIASGGSIYYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSHPPTLPYWGQGTLLVTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHHH

55A01 - 14D09	A0110055A0 1- 35GS- 4CXCR014D0 9(Q108L)	EVQLVESGGGSLVQAGGSLRLSCTTSGRALNMYVMGWFRQAPGNREFVAATSSSGG STSYPD SVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAAYRCAASPYVSTPTMNI LEE YRYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSKRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGNKDYTDAV KDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATR RGYTYWGQGT LVT VSSAAAEQKLISEEDLN GAAHHHHHH
55A01 - 281F12	A0110055A01- 35GS- 4CXCR281F1 2(Q108L)	EVQLVESGGGSLVQAGGSLRLSCTTSGRALNMYVMGWFRQAPGNREFVAATSSSGG STSYPD SVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAAYRCAASPYVSTPTMNI LEE YRYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPGKERE FVA AIGWGPSKTN YADS VKGRFTISRDN AKNTVYLQMNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWRSRSEMYTYWGQ TLVT VSSAAAEQKLISEEDLN GAAHHHHHH
14D09 - 55A01	4CXCR014D0 9(Q108L)- 35GS- A0110055A01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGISSSKRNMGWYRQAPGKQRESVATISSGGN KDYTDAVKDRFTISRDTTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCKIEAGTGWATR RGYTYW GQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGS VQAGGSLRLSCTTSGRALNMYVMGWFRQAPGNREFVAATSSSGGSTSYPD SVKGR FTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAAYRCAASPYVSTPTMNI LEEYRYWGQGT LVT VSSAAAEQKLISEEDLN GAAHHHHHH
281F12 - 55A01	4CXCR281F1 2(Q108L)- 35GS- A0110055A01	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPGKERE FVA AIGWGPS KTN YADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWRSRSE MYTYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGSVQAGGSLRLSCTTSGRALNMYVMGWFRQAPGNREFVAATSSSGGSTSYPD S VKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAAYRCAASPYVSTPTMNI LEEYRYWGQ TLVT VSSAAAEQKLISEEDLN GAAHHHHHH

Tabla 8: potencias de Nanobodies® CXCR4-IL3Ra monovalentes y biespecíficos para inhibir la quimiotaxia inducida por CXCL-12.

Abreviatura	extremo N-terminal	extremo C-terminal	Jurkat E6-1				MOLM-13			
			CI50	LCl al 95%	UCI al 95%	inc. en veces	CI50	LCl al 95%	UCI al 95%	inc. en veces
CXCR4#1	14D09	-	1,04E-08	7,08E-09	1,56E-08	-	8,62E-09	5,33E-09	1,61E-08	-
CXCR4#1- CD123#1	14D09	57A07	1,50E-08	1,00E-08	2,35E-08	0,69	3,60E-09	2,50E-09	5,35E-09	2,39
CXCR4#1- CD123#2	14D09	55A01	1,20E-08	8,20E-09	1,70E-08	0,87	3,60E-09	2,25E-09	5,70E-09	2,39
CD123#1- CXCR4#1	57A07	014D09	2,10E-07	1,60E-07	2,80E-07	0,05	-	-	-	-
CD123#2- CXCR4#1	55A01	014D09	8,50E-08	3,90E-08	1,90E-07	0,12	2,90E-07	1,70E-07	4,90E-07	0,03
CXCR4#2	281F12	-	9,68E-08	7,08E-08	1,33E-07	-	8,60E-08	5,11E-08	1,51E-07	-
CXCR4#2- CD123#1	281F12	57A07	3,80E-08	2,40E-08	6,00E-08	2,55	6,83E-09	4,30E-09	1,20E-08	12,58
CXCR4#2- CD123#2	281F12	55A01	8,60E-08	4,50E-08	1,73E-07	1,13	7,85E-09	5,55E-09	1,30E-08	10,95
CD123#1- CXCR4#2	57A07	281F12	-	-	-	-	-	-	-	-
CD123#2- CXCR4#2	55A01	281F12	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda:

CI50 – promedio de las CI50 respectivas en 2-3 experimentos independientes

LCl – límite inferior del intervalo de confianza al 95% (promedio de 2-3 experimentos independientes)

UCI – límite superior del intervalo de confianza al 95% (promedio de 2-3 experimentos independientes)

inc. en veces – aumento en veces del constructo biespecífico en comparación con el bloque de construcción anti-CXCR4 respectivo

Tabla 10: secuencias de CXCR4-CD4

ID de Nanobody	Código usado en el texto	
281F12	CXCR4#2	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAP GKREFVAAIGWGPSKTNADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTQV TVSS
03F11	CD4#8	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGK EREFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANTVYLE MNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTQVT VSS
03F11-9GS- 281F12	CD4#8-9GSCXCR4#2	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGK EREFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANTVYLE MNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTQVT SSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRA FSRYAMGWFRQAPGKREFVAAIGWGPSKTNADSVKGRFTI SRDNANTVYLMNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSE MYTYWGQGTQVTSS
03F11-25GS- 281F12	CD4#8-25GSCXCR4#2	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGK EREFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANTVYLE MNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTQVT SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPGKREFVAAIGW GPSKTNADSVKGRFTISRDNANTVYLMNTLKPEDTAVYS CAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTQVTSS
03F11-35GS- 281F12	CD4#8-35GSCXCR4#2	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGK EREFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANTVYLE MNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTQVT SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAPG KREFVAAIGWGPSKTNADSVKGRFTISRDNANTVYLM NTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTQVT VSS
281F12-9GS- 03F11	CXCR4#2-9GSCD4#8	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAP GKREFVAAIGWGPSKTNADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTQV TVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTF NVMGWFRQAPGKREFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFT ISRDNANTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPARWDG YDFRGQGTQVTSS

281F12-25GS-03F11	CXCR4#2-25GSCD4#8	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAP GKREFVAAIGWGSPSKTNYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTQV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGS VQPGGSLTSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGKREFVAAVRW SSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANTVYLEMNSLKPEDTAV YYCAADTYNSNPARDWGYDFRGQGTQVTVSS
281F12-35GS-03F11	CXCR4#2-35GSCD4#8	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRAFSRYAMGWFRQAP GKREFVAAIGWGSPSKTNYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNTLKPEDTAVYSCAAKFVNTDSTWSRSEMYTYWGQGTQV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGK EREFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANTVYLE MNSLKPEDTAVYYCAADTYNSNPARDWGYDFRGQGTQVTV SS

A011000025	4CXCR281F12(L108Q)-35GS-4CD003F11(L108Q)-FLAG3-HIS6
A011000026	4CD003F11(L108Q)-35GS-4CXCR281F12(L108Q)-FLAG3-HIS6

Tabla 11: secuencias de EGFR-CEA

ID de Nb	Código usado:	secuencia
NbCEA5	CEA#1	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGKERE VAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTVYLQMNSLRPDDTADYYC AASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200002	CEA#2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQGLEA VAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200003	CEA#3	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGKERE VAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPDDTADYYC AASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200004	CEA#4	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQERE GVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPDDTADY YCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200005	CEA#5	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQERE AVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPDDTADY YCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200006	CEA#6	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQLEA VAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPDDTADYYC AASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200007	CEA#7	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQGLE AVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPDDTADY YCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
7D12	EGFR#1	EVQLVESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKERE SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSS

T023200010	EGFR#10	AVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREF VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSS
T023200011	EGFR#11	EVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSS
T023200012	EGFR#12	AVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREF VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGSTWYGTLYSYDYWGQGTLLTVSS
T023200013	EGFR#13	AVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREF VSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYC AAAAGSTWYGTLYEYDAWGQGTLLTVSS
T023200032	EGFR#32	EVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYSYDYWGQGTLLTVSS
T023200033	EGFR#33	EVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSS
T023200022	EGFR#11- CEA#1	EVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGKEREGVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTV YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200023	EGFR#32- CEA#1	EVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYSYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGKEREGVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTV YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200024	EGFR#11- CEA#5	EVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGQEREAVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNAKNTL YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS
T023200025	EGFR#32- CEA#5	EVQLVESGGGSSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYSYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGSSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGQEREAVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNAKNTL YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTLLTVSS

T023200026	EGFR#1-CEA#1	EVQLVESGGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGKEREGVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTV YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNWYWGQGTLLTVSS
T023200027	EGFR#1-CEA#5	EVQLVESGGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGQEREAVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNWYWGQGTLLTVSS
T023200034	EGFR#33-CEA#1	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLTCAASGSTSRSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGKEREGVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTV YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNWYWGQGTLLTVSS
T023200035	EGFR#33-CEA#5	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLTCAASGSTSRSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSY WMGWFRQAPGQEREAVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNWYWGQGTLLTVSS
T023200028	CEA#1-EGFR#1	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGKEREG VAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTVYLQMNSLRPDDTADYYC AASGVLGGLHEDWFNWYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSY GMGWFRQAPGKEREVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTV DLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSS
T023200029	CEA#5-EGFR#1	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQERE AVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTADY YCAASGVLGGLHEDWFNWYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSR SYGMGWFRQAPGKEREVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNT VDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTLLTVSS
T023200048	CEA#1-ctrl	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGKEREG VAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDTAKNTVYLQMNSLRPDDTADYYC AASGVLGGLHEDWFNWYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDVQLQASGGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPY CMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNKNTV YLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTQ VTVSS

T023200051	CEA#5-ctrl	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGWFRQAPGQERE AVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPDDTADY YCAASGVLGGLHEDWFNFWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGSGGGSGGGGSDVQLQASGGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTI GPYCMGWFRQAPGKEREVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAK NTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYECGHLSTGGYGYDSWGQ GTQVTVSS
T023200049	EGFR#11-ctrl	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLRPDDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDVQLQASGGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPY CMGWFRQAPGKEREVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTV YLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYECGHLSTGGYGYDSWGQGTQ VTVSS
T023200050	EGFR#32-ctrl	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLRPDDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYSYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDVQLQASGGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPY CMGWFRQAPGKEREVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTV YLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYECGHLSTGGYGYDSWGQGTQ VTVSS
T023200052	EGFR#1-ctrl	EVQLVESGGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLRPDDTAIYYCA AAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDVQLQASGGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPY CMGWFRQAPGKEREVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTV YLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYECGHLSTGGYGYDSWGQGTQ VTVSS
T023200053	EGFR#33-ctrl	EVQLVESGGGGSVQAGGSLRLTCAASGSTSRYSYGMGWFRQAPGKEREV SGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLRPDDTAIYYCA AAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDVQLQASGGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPY CMGWFRQAPGKEREVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTV YLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYECGHLSTGGYGYDSWGQGTQ VTVSS

extremo N-terminal	extremo C-terminal			
	CEA#1	CEA#5	EGFR#1	control
EGFR#1	BI#26	BI#27		BI#52
EGFR#11	BI#22	BI#24		BI#49
EGFR#32	BI#23	BI#25		BI#50
EGFR#33	BI#34	BI#35		BI#53
CEA#1			BI#28	BI#48
CEA#5			BI#29	BI#51

Tabla 12: secuencias de CD4-IL12R y CD4-IL23R

ID de Nb	Código usado en el texto	Secuencia
----------	--------------------------	-----------

03F11	CD4#8	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKER EFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNKNTVYLEMNSLK PEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSS
LG150C02	IL23R#18	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASEGFTIYPLGWFRQAPGKDR KFVAALPWSAGIPQYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNLKPE DTAVYYCAAKGRDDSYQPWNYWGQGTTLTVSS
LG150D02	IL23R#19	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCVASGRFTSTDVMGWFRQAPGK EREFVAAHRTSGISTVYAASVKGRFTISRDNKNTVYLGMSLKLP EDTAVYVCAAGSDASGGYDYWGQGTTLTVSS
LG150H07	IL23R#20	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGK DREFVAAISWIGESTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLRMNSLKLP EDTAVYYCAADLYYTAYVAAADEYDYWGQGTTLTVSS
LG148C09	IL12Rb1#30	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTPRLVAMGWFRQTPGK EREFVGEILSKGFTYYADSVKGRFTISRVNAKNTITMYLQMNSLK SEDTAVYYCAGRQNWSGSPARTNEYEYWGQGTTLTVSS
LG148F09	IL12Rb1#31	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTPSIAMGWFRQTPGKE REFVGEILSKGFTYYADSVKGRFTISRANAKNTITMYLQMNSLKS EDTAVYYCAARQNWSGNPTRTNEYEYWGQGTTLTVSS
LG135B08	IL12Rb2#1	EVQLVESGGRLVQAGDSLRLSCAASGRFTISYRMGWFRQAPGKE REFVAALRWSSSNIDYTYADSVKGRFSISGDYAKNTVYLQMNSL KAEDTAVYYCAASTRWGVMESDTEYTSWGQGTTLTVSS
LG135A07	IL12Rb2#2	EVQLVESGGRLVQAGDSLRLSCAASGRFTTSYRMGWFRQAPGK EREFVSALRWSSGNIDYTYADSVKGRFSISGDYAKNTVYLQMNS LKAEDTAVYYCAASTRWGVMESDTEYTSWGQGTTLTVSS
T023200036	IL12Rb2#1-CD4#8	EVQLVESGGRLVQAGDSLRLSCAASGRFTISYRMGWFRQAPGKE REFVAALRWSSSNIDYTYADSVKGRFSISGDYAKNTVYLQMNSL KAEDTAVYYCAASTRWGVMESDTEYTSWGQGTTLTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGS VQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKEREFVAAVRWSST GIYYTQYADSVKSRFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAA DTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSS
T023200037	IL12Rb2#2-CD4#8	EVQLVESGGRLVQAGDSLRLSCAASGRFTTSYRMGWFRQAPGK EREFVSALRWSSGNIDYTYADSVKGRFSISGDYAKNTVYLQMNS LKAEDTAVYYCAASTRWGVMESDTEYTSWGQGTTLTVSSGGGG SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGS VQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKEREFVAAVRWSST GIYYTQYADSVKSRFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAA DTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSS
T023200038	CD4#8-IL12Rb2#1	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKER EFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNKNTVYLEMNSLK PEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGRLVQ AGDSLRLSCAASGRFTISYRMGWFRQAPGKEREFVAAALRWSSSN IDYTYADSVKGRFSISGDYAKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCAAS TRWGVMESDTEYTSWGQGTTLTVSS

T023200039	CD4#8-IL12Rb2#2	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGKER EFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANKNTVYLEMNSLK PEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGRLVQ AGDSLRLSCAASGRFTFSYRMGWFRQAPGKEREFVSALRWSSG NIDYTYADSVKGRFSISGDYAKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCA ASTRWGVMESEDTEYTSWGQGTTLTVSS
T023200040	CD4#8-IL12Rb1#30	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGKER EFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANKNTVYLEMNSLK PEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QTGGSLRLSCAASGRTPRLVAMGWFRQTPGKEREFVGEILSKGF TYYADSVKGRFTISRNVNAKNTITMYLQMNSLKSEDTAVYYCAGR QNWSGSPARTNEYEYWGQGTTLTVSS
T023200041	CD4#8-IL12Rb1#31	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGKER EFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANKNTVYLEMNSLK PEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QTGGSLRLSCAASGRTPSIAMGWFRQTPGKEREFVGEILSKGFT YYADSVKGRFTISRANAKNTITMYLQMNSLKSEDTAVYYCAARQ NWSGNPRTTNEYEYWGQGTTLTVSS
T023200042	IL23R#19-CD4#8	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCVASGRFTFSTDVFMGWFRQAPGK EREFVAAHRTSGISTVYAASVKGRFTISRDNANKNTVYLMKSLKP EDTAVYYCAAGSDASGGYDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQPGGSL TLSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGKEREFVAAVRWSSTGIYYTQY ADSVKSRFTISRDNANKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAADTYNSN PARWDGYDFRGQGTTLTVSS
T023200043	IL23R#20-CD4#8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGK DREFVAAISWIGESTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLRMNSLKP EDTAVYYCAADLYTAYVAAADEYDYWGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSV QPGGSLTSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGKEREFVAAVRWSSTG IYYTQYADSVKSRFTISRDNANKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAAD TYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSS
T023200044	CD4#8-IL23R#20	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRFTFNMVGWFRQAPGKER EFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNANKNTVYLEMNSLK PEDTAVYYCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGTTLTVSSGGGGSG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKDREFVAAISWIGE STYYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLRMNSLKPEDTAVYYCAADLY YTAYVAAADEYDYWGQGTTLTVSS

T023200045	CD4#8-IL23R#19	EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKER EFVAAVRWSSTGIYYTQYADSVKSRFTISRDNKNTVYLEMNSLK PEDTAVYYCAADTYNSNPARDWDGYDFRGQGTTLTVTVSSGGGGSG GGGGGGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLTSCVASGRTFSTDVMGWFRQAPGKEREFVAAHRTSGI STVYAASVKGRFTISRDNKNTVYLGMSKLPEDTAVYVCAAGS DASGGYDYWGQGTTLTVTVSS
T023200046	IL12Rb1#30-CD4#8	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTPLRVAMGWFRQTPGK EREFVGEIILSKGFTYYADSVKGRFTISRNVNAKNTITMYLQMNSLK SEDTAVYYCAGRQNWSGSPARTNEYEYWGQGTTLTVTVSSGGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGSEVQLVESGGGS VQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKEREFVAAVRWSST GIYYTQYADSVKSRFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAA DTYNSNPARDWDGYDFRGQGTTLTVTVSS
T023200047	IL12Rb1#31-CD4#8	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTPSIIAMGWFRQTPGKE REFVGEIILSKGFTYYADSVKGRFTISRANAKNTITMYLQMNSLKS EDTAVYYCAARQNWSGNPTRTNEYEYWGQGTTLTVTVSSGGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGSEVQLVESGGGS VQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKEREFVAAVRWSST GIYYTQYADSVKSRFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCAA DTYNSNPARDWDGYDFRGQGTTLTVTVSS

extremo N-terminal	extremo C-terminal		
	CD4#8	IL12Rb2#1	IL12Rb2#2
	CD4#8	BI#38	BI#39
	IL12Rb2#1	BI#36	
	IL12Rb2#2	BI#37	

extremo N-terminal	extremo C-terminal		
	CD4#8	IL12Rb1#30	IL12Rb1#31
	CD4#8	BI#40	BI#41
	IL12Rb1#30	BI#46	
	IL12Rb1#31	BI#47	

extremo N-terminal	extremo C-terminal		
	CD4#8	IL23R#19	IL23R#20
	CD4#8	BI#45	BI#44
	IL23R#19	BI#42	
	IL23R#20	BI#43	

5 Tabla 13: CXCR4-CD123

ID de Nanobody		Código usado en el texto:
A011000003	4CXCR281F12(Q108L)-35GS-A0110055A01-CMYC-HIS6	CXCR4#2-CD123#5
A011000004	4CXCR281F12(Q108L)-35GS-A0110057A07-CMYC-HIS6	CXCR4#2-CD123#7
A011000007	4CXCR014D09(Q108L)-35GS-A0110055A01-CMYC-HIS6	CXCR4#1-CD123#5
A011000008	A0110055A01-35GS-4CXCR014D09(Q108L)-CMYC-HIS6	CD123#5-CXCR4#1
A011000010	A0110057A07-35GS-4CXCR281F12(Q108L)-CMYC-HIS6	CD123#7-CXCR4#2
A011000011	A0110057A07-35GS-4CXCR014D09(Q108L)-CMYC-HIS6	CD123#7-CXCR4#1
A011000015	A0110055A01-35GS-4CXCR281F12(Q108L)-CMYC-HIS6	CD123#5-CXCR4#2
A011000016	4CXCR014D09(Q108L)-35GS-A0110057A07-CMYC-HIS6	CXCR4#1-CD123#7
A011000017	4CXCR281F12-35GS-A0110055A01-FLAG3-HIS6	CXCR4#2-CD123#5
A011000018	4CXCR281F12-35GS-A0110057A07-FLAG3-HIS6	CXCR4#2-CD123#7
A011000019	4CXCR014D09-35GS-A0110055A01-FLAG3-HIS6	CXCR4#1-CD123#5

A011000020	4CXCR014D09-35GS-A0110057A07-FLAG3-HIS6	CXCR4#1-CD123#7
A011000021	A0110057A07-35GS-4CXCR281F12-FLAG3-HIS6	CD123#7-CXCR4#2
A011000022	A0110055A01-35GS-4CXCR281F12-FLAG3-HIS6	CD123#5-CXCR4#1
A011000023	A0110057A07-35GS-4CXCR014D09-FLAG3-HIS6	CD123#7-CXCR4#1
A011000024	A0110055A01-35GS-4CXCR014D09-FLAG3-HIS6	CD123#5-CXCR4#2
A011000025	4CXCR281F12(L108Q)-35GS-4CD003F11(L108Q)-FLAG3-HIS6	CXCR#2-CD4#8
A011000026	4CD003F11(L108Q)-35GS-4CXCR281F12(L108Q)-FLAG3-HIS6	CD4#2-CXCR4#2
A011000027	4CXCR281F12-Flag3-His6	CXCR4#2
A011000028	4CXCR014D09-Flag3-His6	CXCR4#1

extremo N-terminal	extremo C-terminal			
	CXCR4#2	CXCR4#1	CD123#7	CD123#5
CXCR4#2			BI#4/18	BI#3/17
CXCR4#1			BI#16/20	BI#7/19
CD123#7	BI#10/21	BI#11/23		
CD123#5	BI#15/24	BI#8/22		

Tabla B-4: secuencias de agente de unión a albúmina de la divulgación

Alb11	114	EVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDITAVYYC TIGGSLSRSSQGTTLTVSS
Alb8	115	EVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDITAVYYC TIGGSLSRSSQGTTLTVSSAAAEQKLISEEDLNAAHHHHHH

5

Tabla B-5: secuencias de ligador de la divulgación

Nombre de ligador	SEQ ID NO:	Secuencias de aminoácidos
5GS	117	GGGGS
6GS	118	SGGSGGS
9GS	119	GGGSGGGS
10GS	120	GGGSGGGGS
15GS	121	GGGSGGGSGGGGS
18GS	122	GGGSGGGSGGGSGGGGS
20GS	123	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
25GS	124	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
30GS	125	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
35GS	126	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que comprende unos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISV) primero y segundo, en el que

- dicho primer ISV se une a una primera diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 200 nM tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial;

- dicho segundo ISV se une a una segunda diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 0,1 pM tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; y

en el que dicho primer ISV y dicho segundo ISV se unen a dicha primera diana y dicha segunda diana presentes en la superficie de la misma célula,

en el que dicha primera diana es diferente de dicha segunda diana,

en el que dicho segundo ISV potencia la unión de dicho primer ISV,

en el que la unión por dicho primer ISV inhibe una función de dicha primera diana,

en el que dicha primera diana se elige del grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras (preferiblemente de clase I), GPCR, DDR1, discoidina I (antígeno CD167a), DDR2, ErbB-1, C-erbB-2, FGFR-1, FGFR-3, antígeno CD135, antígeno CD 117, proteína tirosina cinasa-1, c-Met, antígeno CD148, C-ret, ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, antígeno CD202b, Trk-A, Trk-B, Trk-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, receptor Notch 1-4, receptor FAS, DR5, DR4, CD47, CX3CR1, CXCR-3, CXCR-4, CXCR-7, proteína 2 de unión a quimiocina, y CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11; y

dicha segunda diana se elige del grupo que consiste en antígeno carcinoembrionario ("CEA"), MART-1, gp100, MAGE-1, HER-2, y antígenos de Lewis^x, CD123, CD44, CLL-1, CD96, CD47, CD32, CXCR4, Tim-3, CD25, TAG-72, Ep-CAM, PSMA, PSA, GD2, GD3, CD4, CD5, CD19, CD20, CD22, CD33, CD36, CD45, CD52 y CD147; y receptores de citocinas incluyendo cadena gamma del receptor de interleucina-2 (antígeno CD132); cadena alfa del receptor de interleucina-10 (IL-10R-A); cadena beta del receptor de interleucina-10 (IL-10R-B); cadena beta-1 del receptor de interleucina-12 (IL-12R-beta1); cadena beta-2 del receptor de interleucina-12 (beta-2 del receptor de IL-12); cadena alfa-1 del receptor de interleucina-13 (IL-13R-alfa-1) (antígeno CD213 al); cadena alfa-2 del receptor de interleucina-13 (proteína de unión a interleucina-13); receptor de interleucina-17 (receptor de IL-17); receptor de interleucina-17B (receptor de IL-17B); precursor del receptor de interleucina-21 (IL-21R); receptor de interleucina-1, tipo I (IL-1R-1) (CD121a); receptor de interleucina-1, tipo II (IL-1R-beta) (CDw121b); proteína antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra); cadena alfa del receptor de interleucina-2 (antígeno CD25); cadena beta del receptor de interleucina-2 (antígeno CD122); cadena alfa del receptor de interleucina-3 (IL-3R-alfa) (antígeno CD123).

2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que dicha célula es una célula enferma, preferiblemente una célula cancerosa.

3. Polipéptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha célula comprende una razón de 0,01 a 0,9 de dicha primera diana y dicha segunda diana, incluso más preferiblemente entre 0,2 y 0,8, entre 0,3 y 0,7, entre 0,4 y 0,6, tal como una razón de 0,02, 0,05, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, preferiblemente una razón de 0,5.

4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho polipéptido

- tiene una constante de velocidad de asociación (K_{on}) para dicha primera diana seleccionada del grupo que consiste en: aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o

- tiene una constante de velocidad de disociación (K_{off}) para dicha primera diana seleccionada del grupo que consiste en: aproximadamente 10^{-3} s^{-1} , aproximadamente 10^{-4} s^{-1} , aproximadamente 10^{-5} s^{-1} y aproximadamente 10^{-6} s^{-1} , tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial, y/o

- tiene una constante de disociación (K_D) para dicha primera diana seleccionada del grupo que consiste en: aproximadamente 10^{-7} M , aproximadamente 10^{-8} M , aproximadamente 10^{-9} M , aproximadamente 10^{-10} M , aproximadamente 10^{-11} M y aproximadamente 10^{-12} M , tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial.

5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho primer ISV
- se une a una primera diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 200 nM, tal como un valor de K_D promedio de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 ó 190 nM, tal como se mide mediante SPR, y/o
 - inhibe la quimiotaxia en aproximadamente el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 80%, el 90% y preferiblemente el 95% o más en un ensayo de quimiotaxia, y/o
 - inhibe la anaplasia, invasión, metástasis, proliferación, diferenciación, migración y/o supervivencia de dicha célula, y/o
 - aumenta la apoptosis, destrucción celular y/o detención del crecimiento de dicha célula.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho segundo ISV
- se une a una segunda diana con un valor de K_D promedio de entre 10 nM y 0,1 pM, tal como a un valor de K_D promedio de 10 nM o menos, incluso más preferiblemente a un valor de K_D promedio de 9 nM o menos, tal como menos de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 nM o incluso menos, tal como menos de 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 pM, o incluso menos tal como menos de 0,4 pM, tal como se mide mediante SPR, y/o
 - inhibe la unión de un ligando natural a dicha segunda diana en menos del 50%, tal como el 40%, el 30% o el 20% o incluso menos del 10%, tal como menos del 5%.
7. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha primera diana y dicha segunda diana se eligen del grupo que consiste en:
- EGFR como primera diana y CEA como segunda diana;
 - tirosina cinasa receptora como primera diana y un antígeno asociado a tumor (AAT) como segunda diana;
 - receptor acoplado a proteínas G (GPCR) como primera diana y un antígeno de diferenciación hematopoyética como segunda diana;
 - tirosina cinasa receptora como primera diana y un antígeno de diferenciación hematopoyética como segunda diana;
 - receptor acoplado a proteínas G (GPCR) como primera diana y un antígeno asociado a tumor (AAT) como segunda diana;
 - CXCR4 como primera diana y CD123 como segunda diana;
 - DR5 como primera diana y EpCam como segunda diana;
 - DR4 como primera diana y EpCam como segunda diana;
 - CD95 como primera diana y EpCam como segunda diana;
 - CD47 como primera diana y CD123 como segunda diana;
 - CD47 como primera diana y EpCam como segunda diana;
 - CD4 como primera diana y CXCR4 como segunda diana;
 - IL12R β 1 como primera diana y CD4 como segunda diana;
 - IL12R β 2 como primera diana y CD4 como segunda diana; y
 - IL23R como primera diana y CD4 como segunda diana.
8. Polipéptido según la reivindicación 7, en el que dicha primera diana y dicha segunda diana se eligen del grupo que consiste en:
- EGFR como primera diana y CEA como segunda diana;

- CXCR4 como primera diana y CD123 como segunda diana;
- CD4 como primera diana y CXCR4 como segunda diana;
- 5 - IL12R β 2 como primera diana y CD4 como segunda diana; y
- IL23R como primera diana y CD4 como segunda diana.
- 9. Polipéptido según la reivindicación 8,
- 10 - en el que dicho ISV que se une a EGFR se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 39-45;
- en el que dicho ISV que se une a CEA se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32-38;
- 15 - en el que dicho ISV que se une a CXCR4 se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8 y 24;
- en el que dicho ISV que se une a CD123 se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-15;
- en el que dicho ISV que se une a CD4 se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 26 y 62;
- 20 - en el que dicho ISV que se une a IL12R β 1 se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 66-67;
- en el que dicho ISV que se une a IL12R β 2 se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 68-69;
- 25 - en el que dicho ISV que se une a IL23R se elige del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 63-65.
- 10. Polipéptido según la reivindicación 8, elegido del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16-23, 26-31, 46-55 y 70-81.
- 30 11. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un fármaco, tal como una toxina o un resto de toxina.
- 12. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un agente de obtención de imágenes incluyendo, pero sin limitarse a, una molécula seleccionada preferiblemente del
- 35 grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos de metal, metales, oro coloidal, marcador fluorescente, marcador metálico, biotina, agente quimioluminiscente, agente bioluminiscente, cromóforo y mezclas de los mismos.
- 40 13. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 14. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en un método para administrar un polipéptido profiláctico o terapéutico, un conjugado polipéptido-fármaco (PDC) o agente de obtención de
- 45 imágenes a una ubicación, un tejido o un tipo de célula específicos en el cuerpo, comprendiendo el método las etapas de administrar a un sujeto un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 15. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesita.
- 50

FIGURA 1.1



FIGURA 1.2

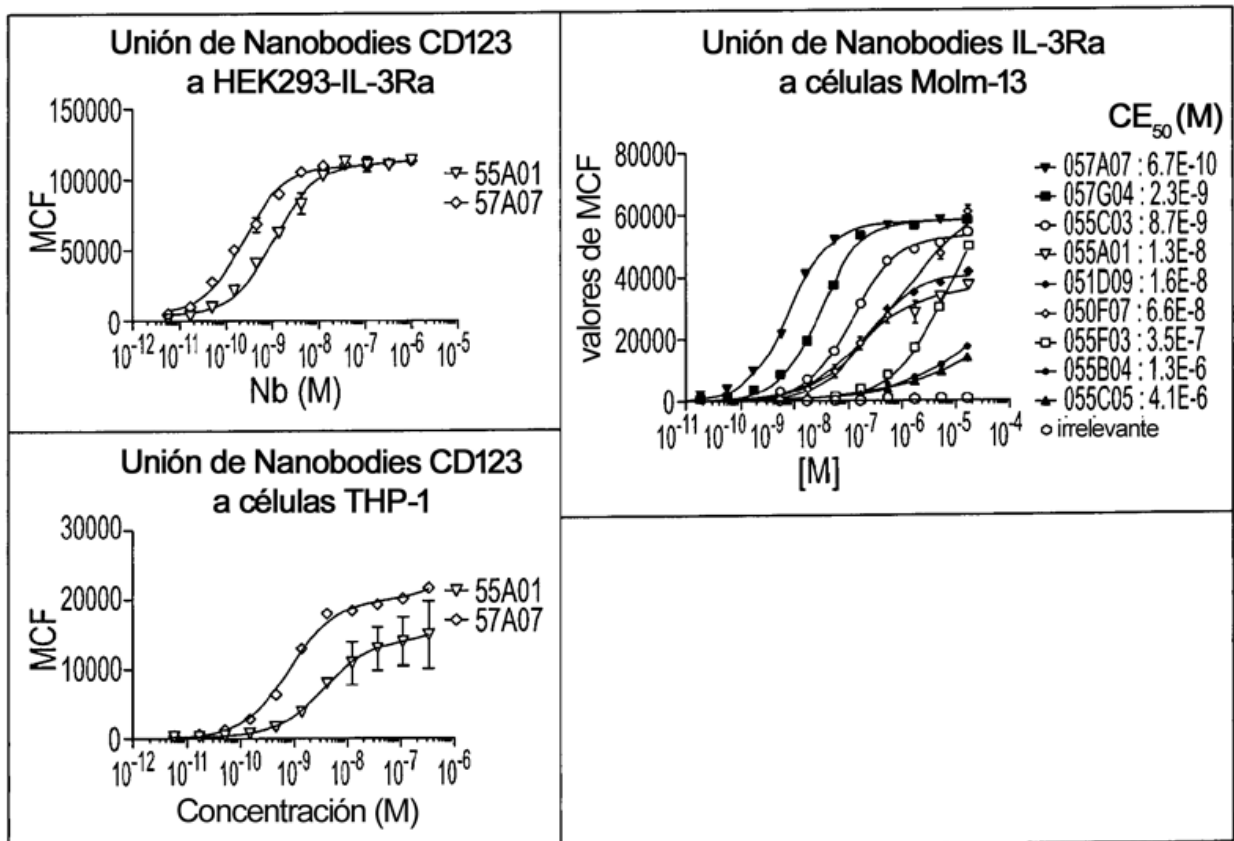


FIGURA 1.3

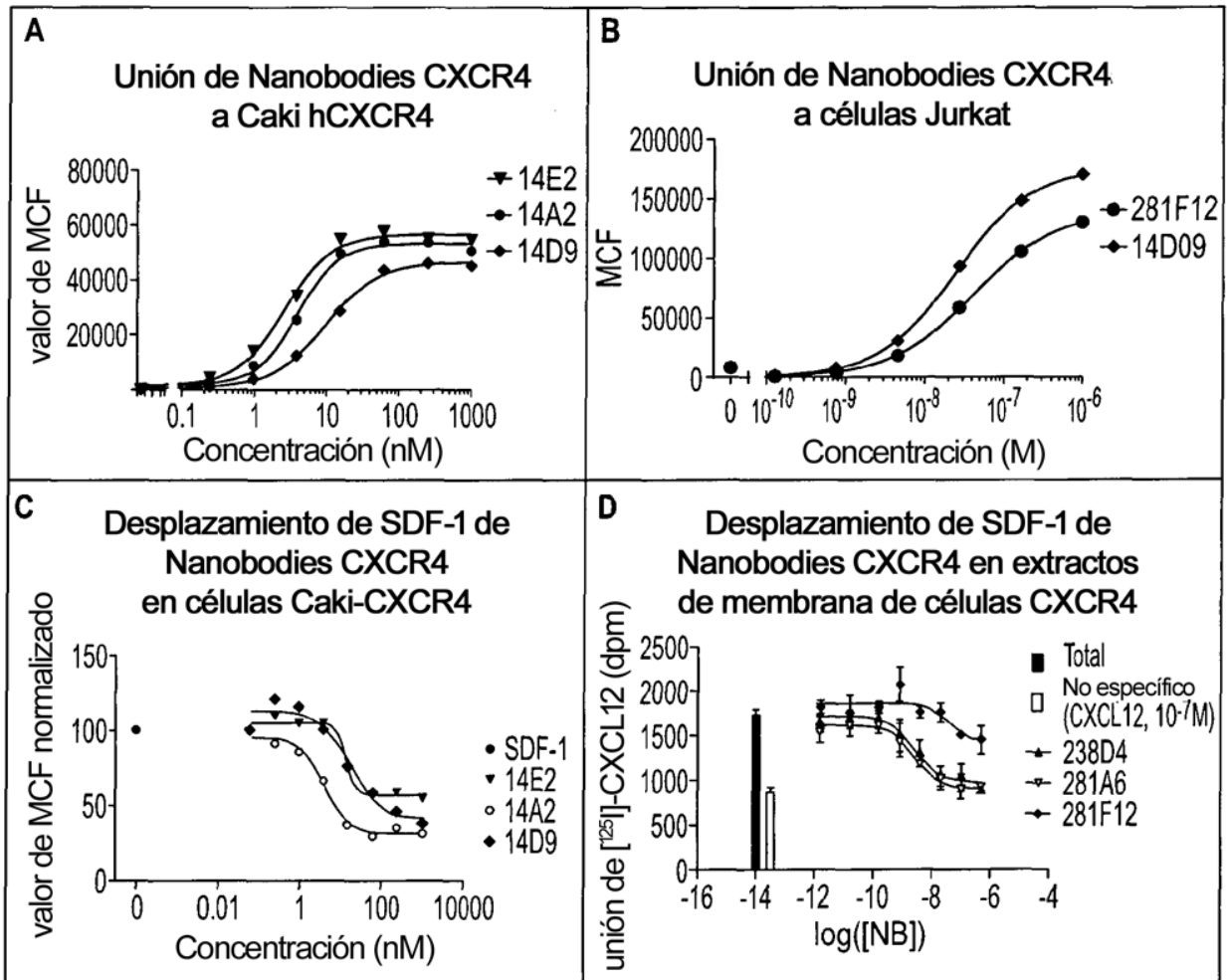


FIGURA 1.4

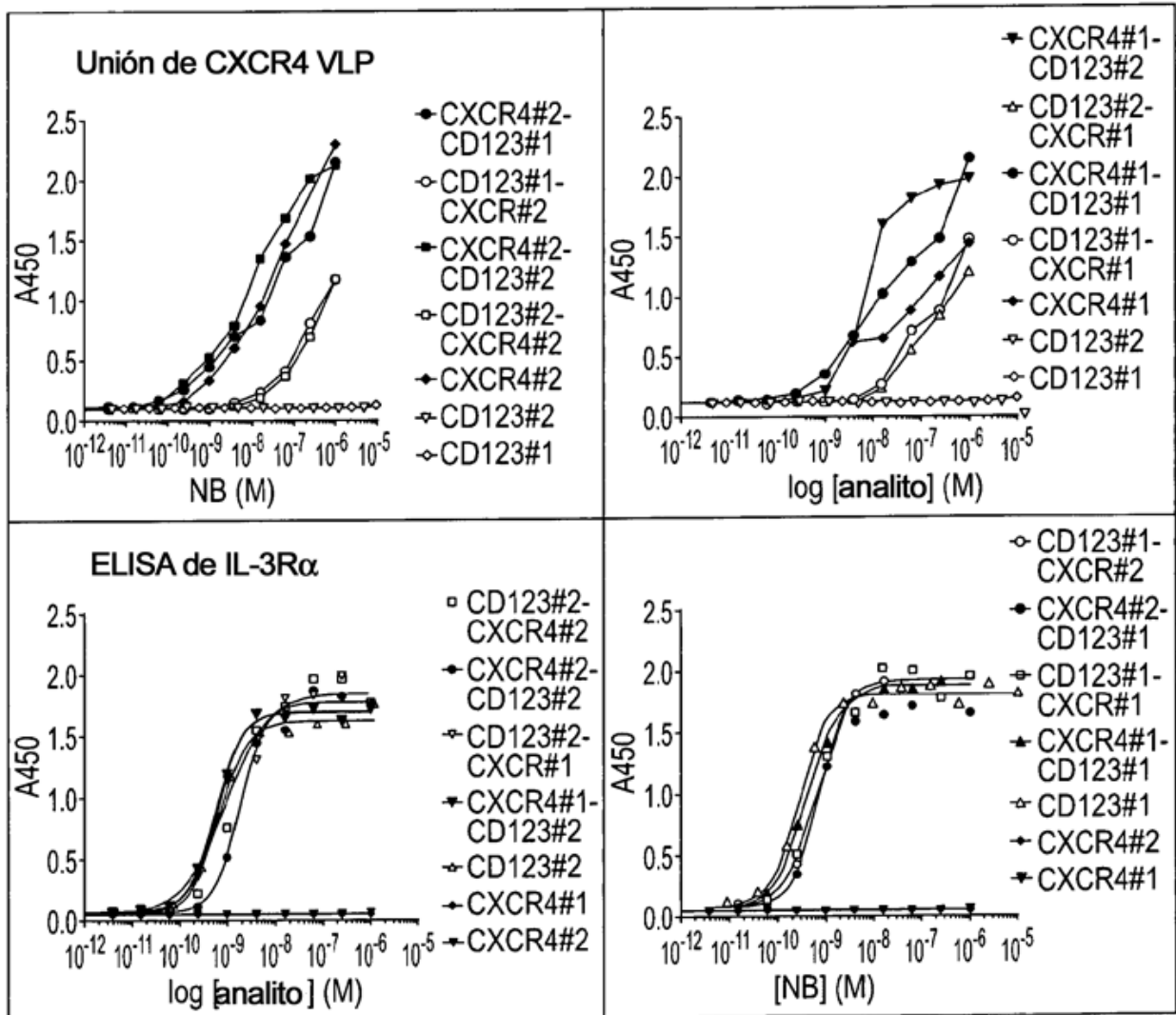


FIGURA 1.5

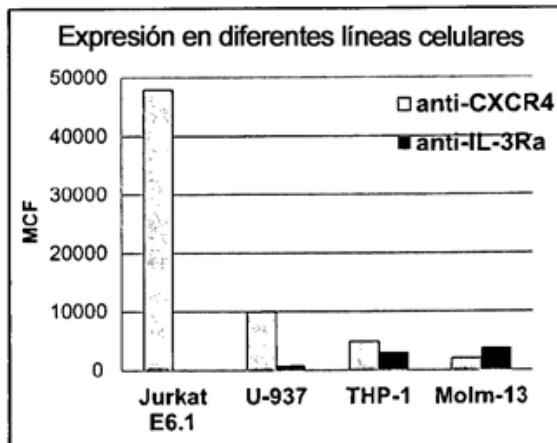


FIGURA 1.6

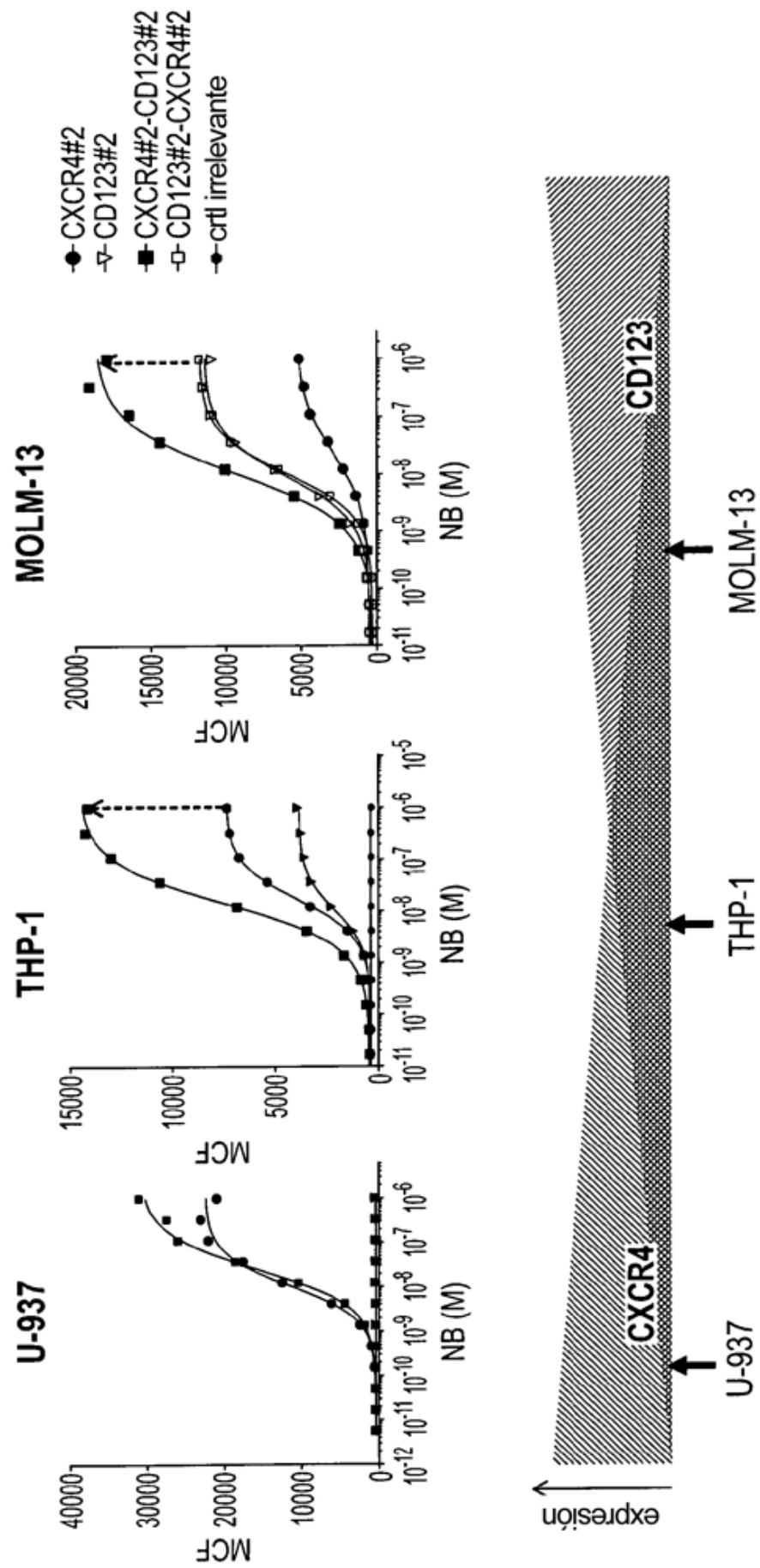


FIGURA 1.7

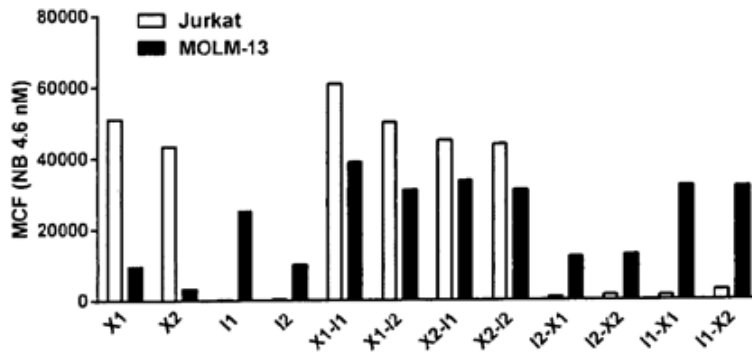


FIGURA 1.8

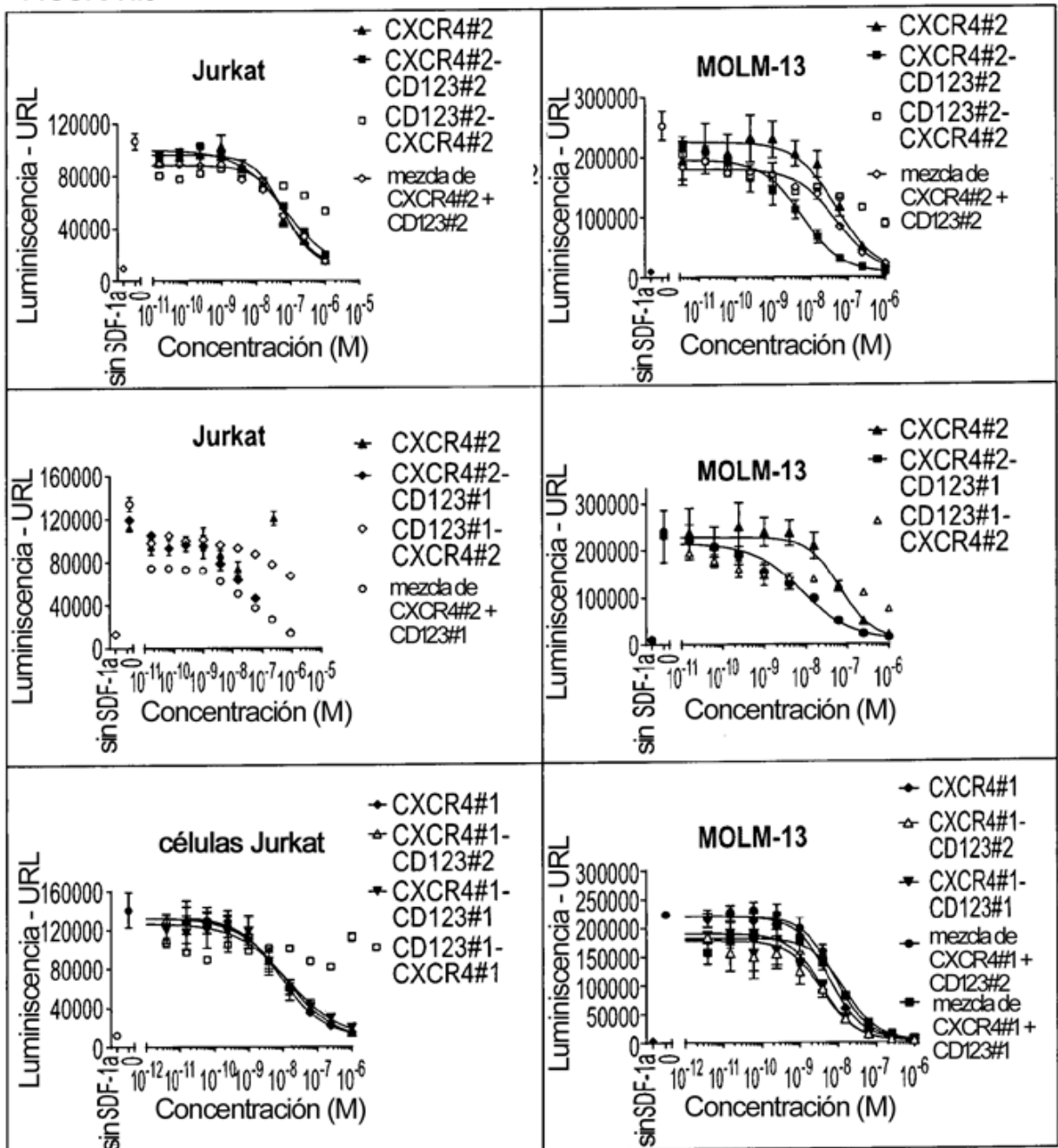
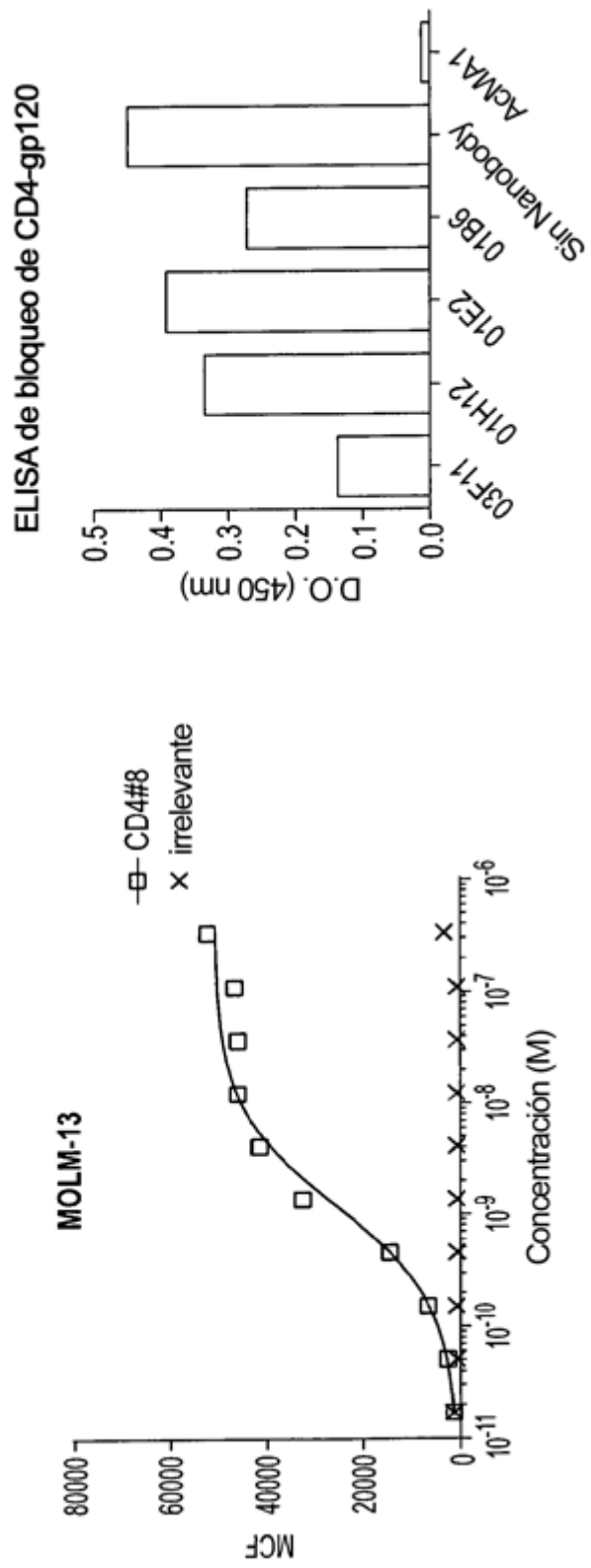


FIGURA 2.1



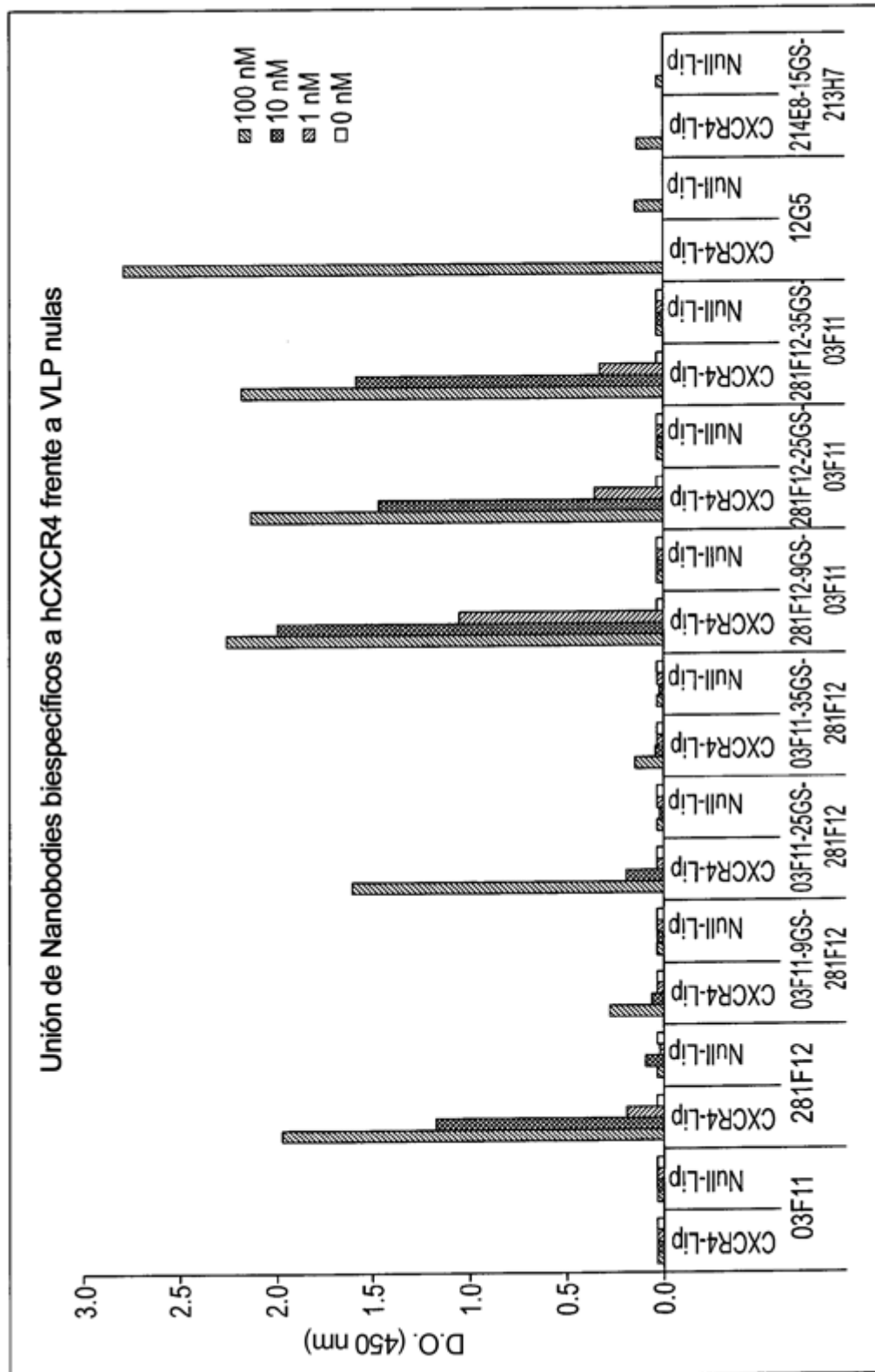


FIGURA 2.2

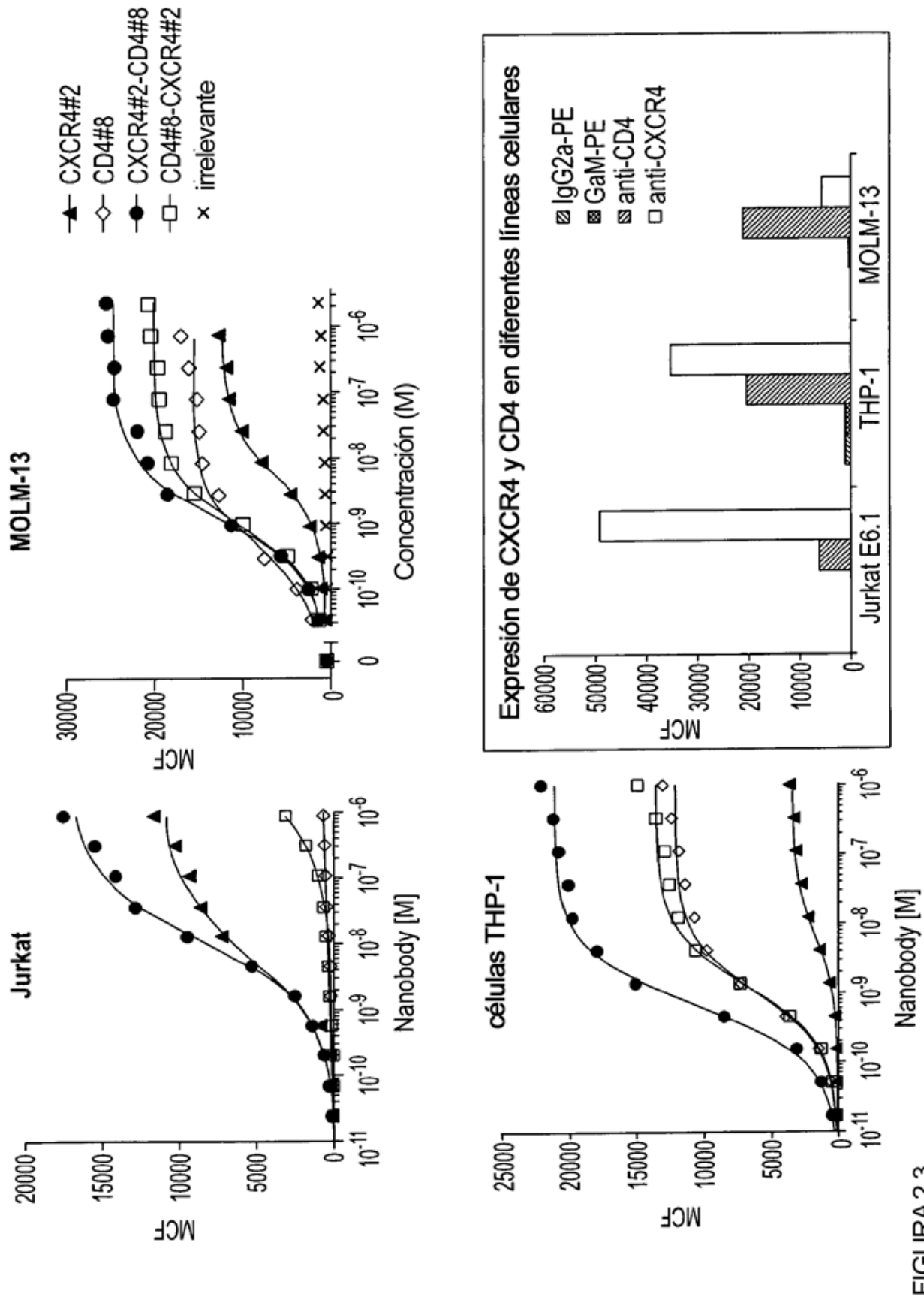


FIGURA 2.3

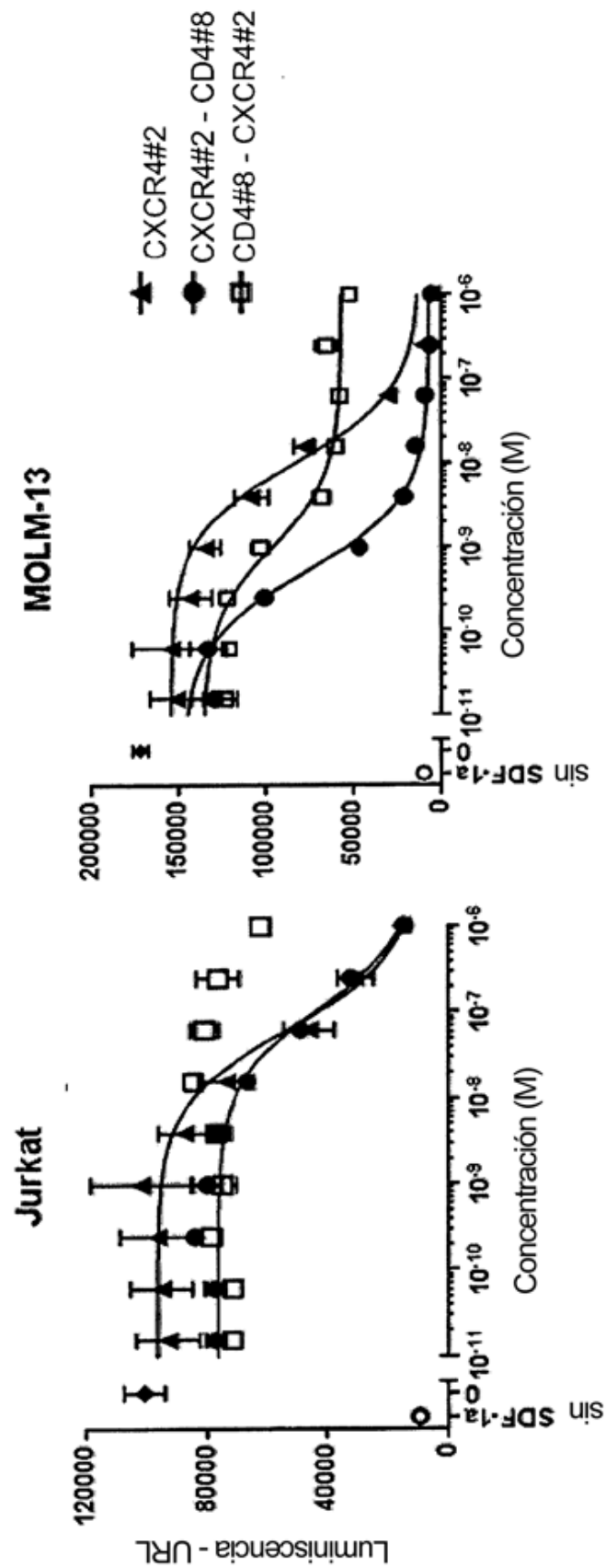


FIGURA 2.4

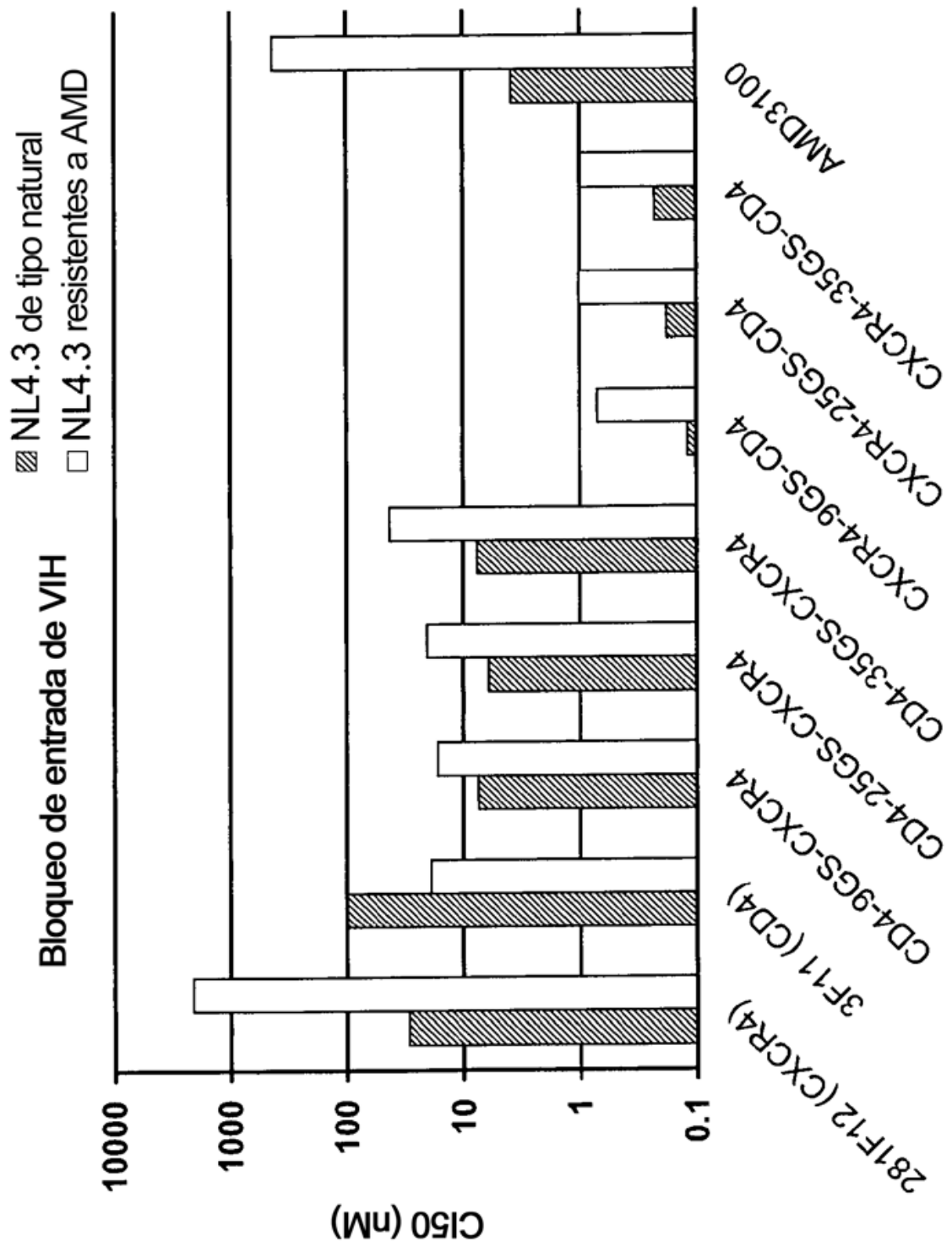


FIGURA 2.5

FIGURA 3.1

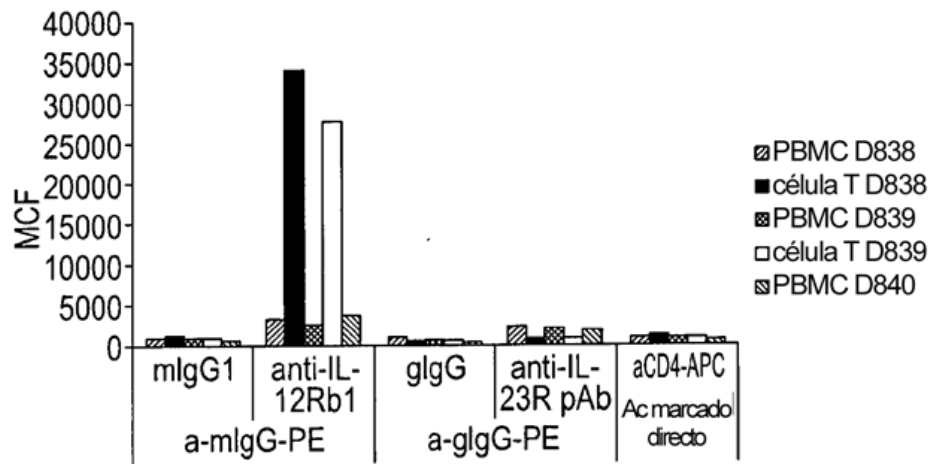


FIGURA 3.2

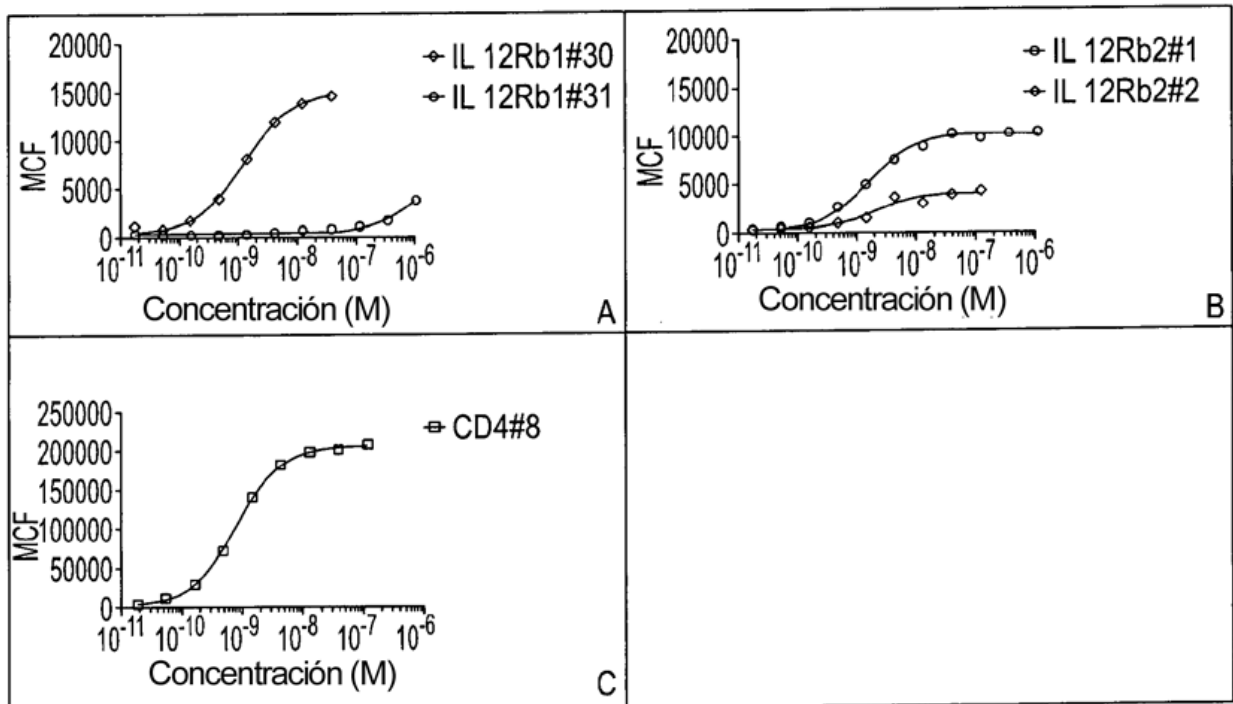


FIGURA 3.3

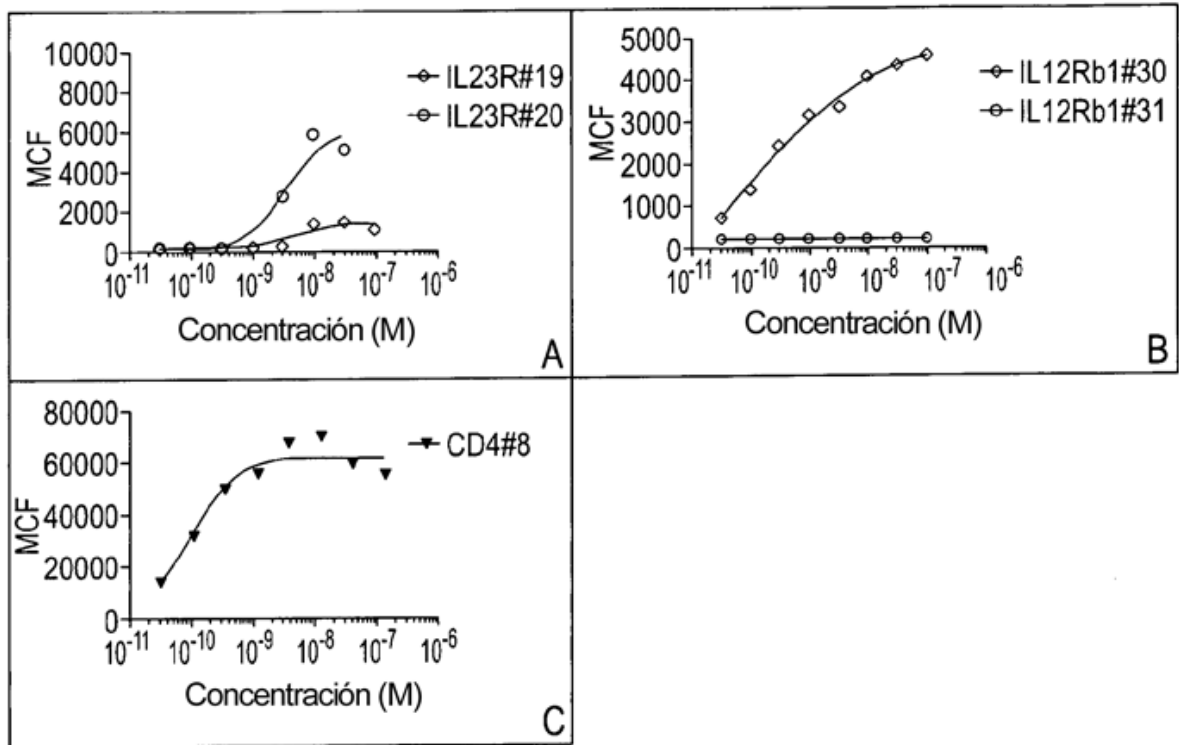


FIGURA 3.4

extremo C-terminal extremo N-terminal	CD4#8	IL12Rb2#1	IL12Rb2#2
CD4#8		BI#38	BI#39
IL12Rb2#1	BI#36		
IL12Rb2#2	BI#37		

	CD4#8	IL12Rb1#30	IL12Rb1#31
CD4#8		BI#40	BI#41
IL12Rb1#30	BI#46		
IL12Rb1#31	BI#47		

	CD4#8	IL23R#19	IL23R#20
CD4#8		BI#45	BI#44
IL23R#19	BI#42		
IL23R#20	BI#43		

FIGURA 3.5

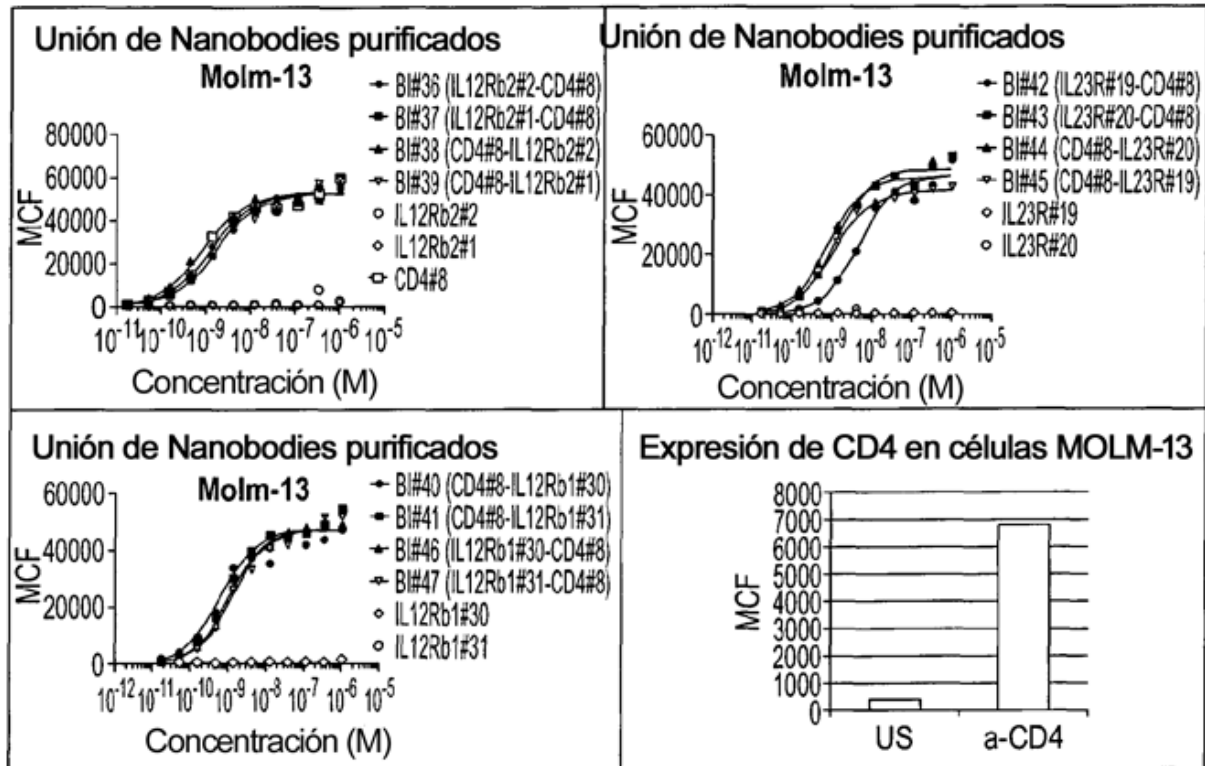


FIGURA 3.6

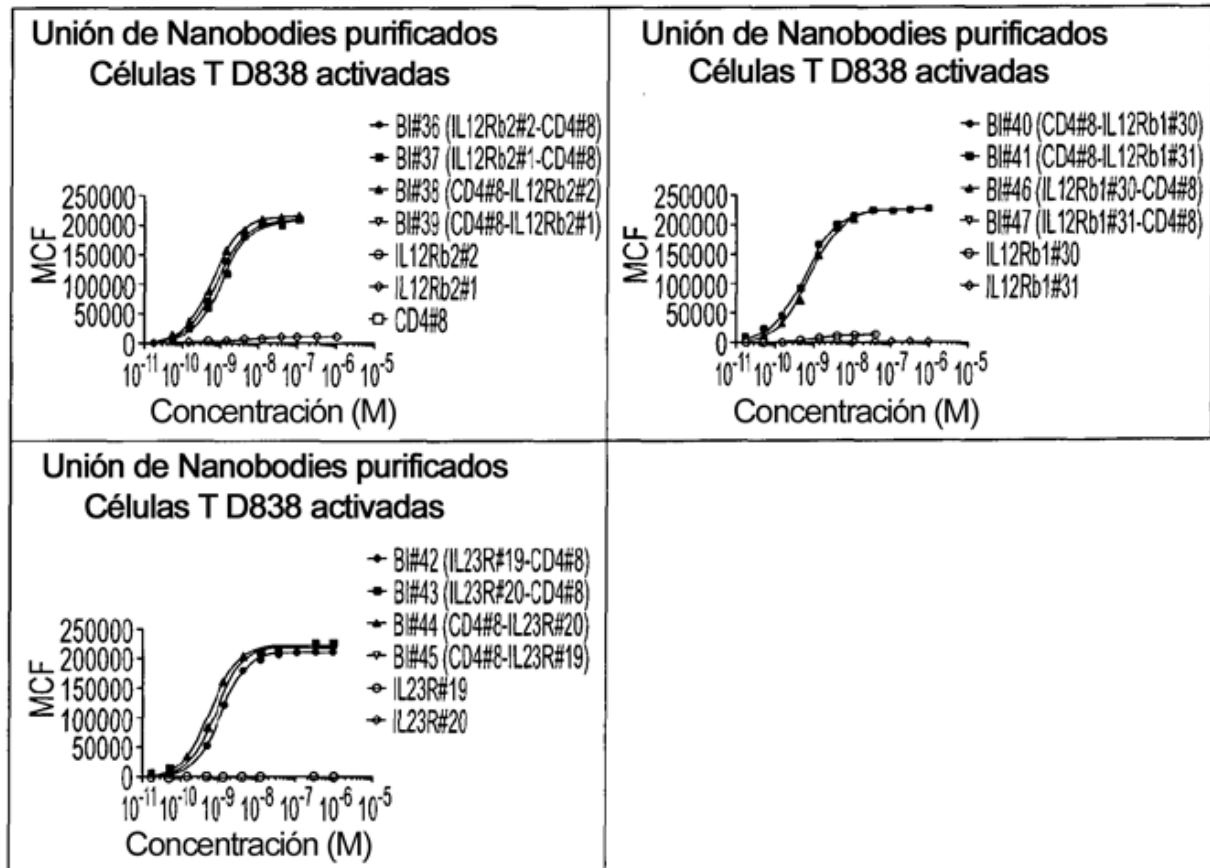


FIGURA 3.7

Unión de Nanobodies purificados
Células T CD8+ D863 aisladas

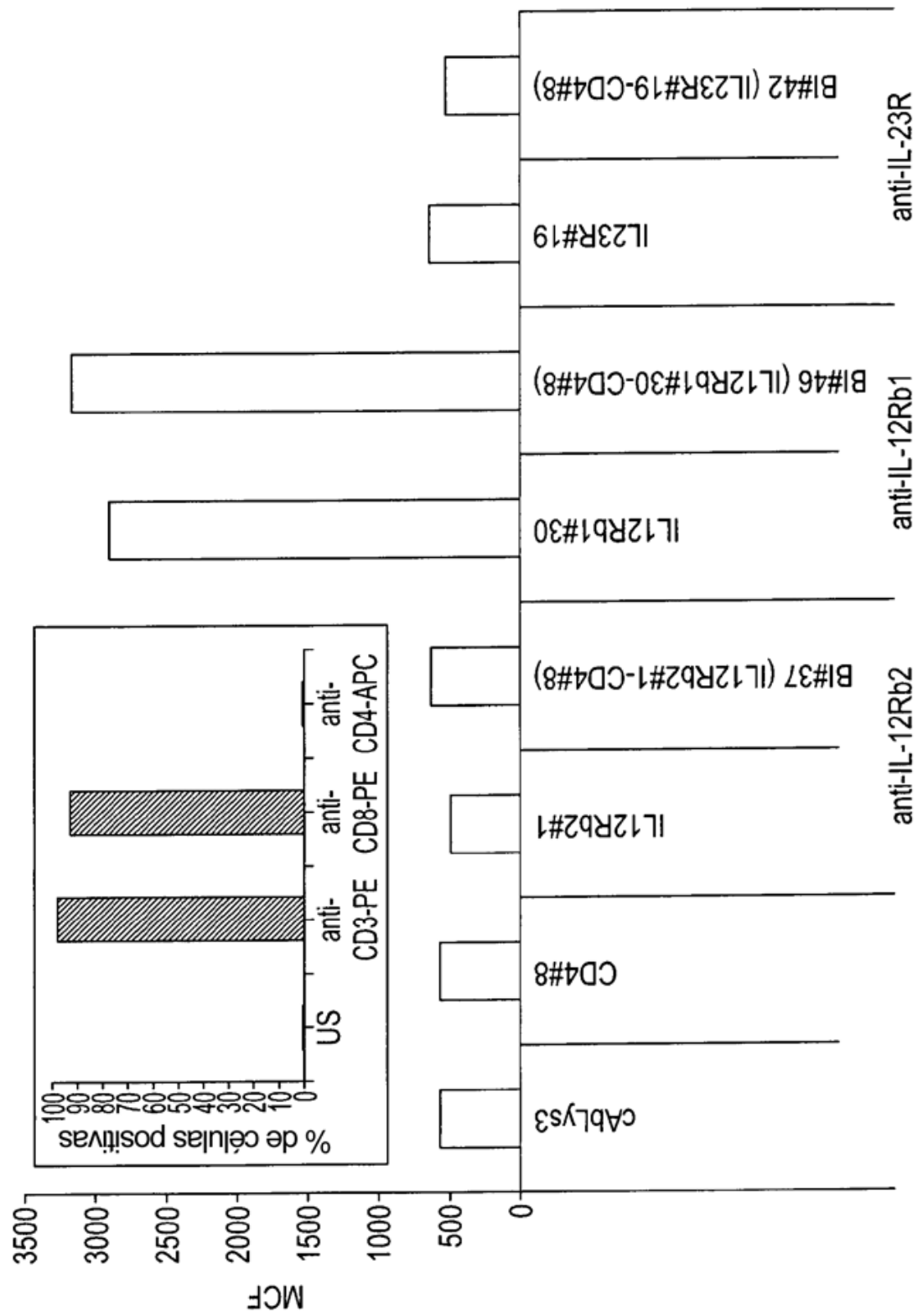


FIGURA 3.8

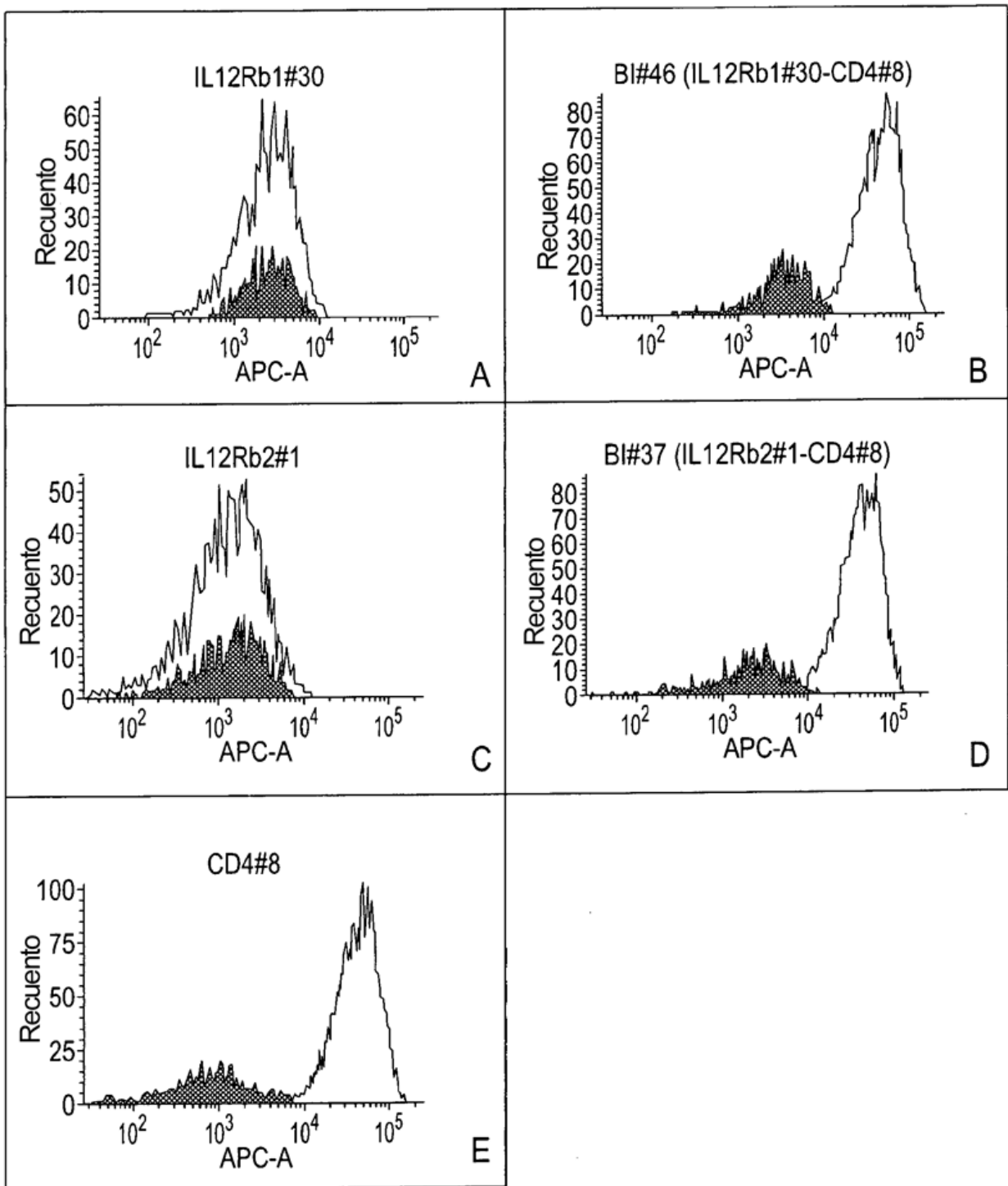


FIGURA 3.9

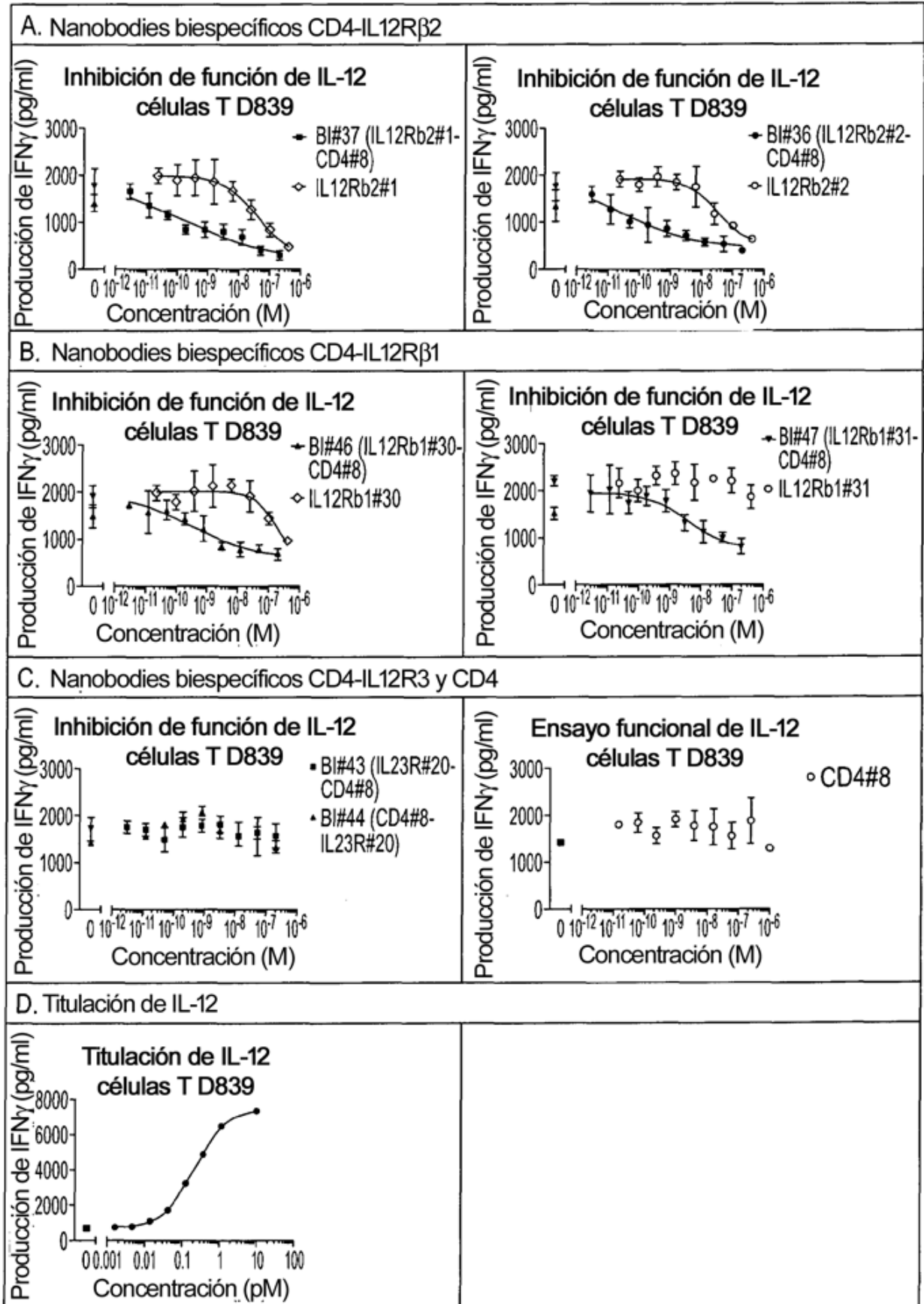


FIGURA 3.10

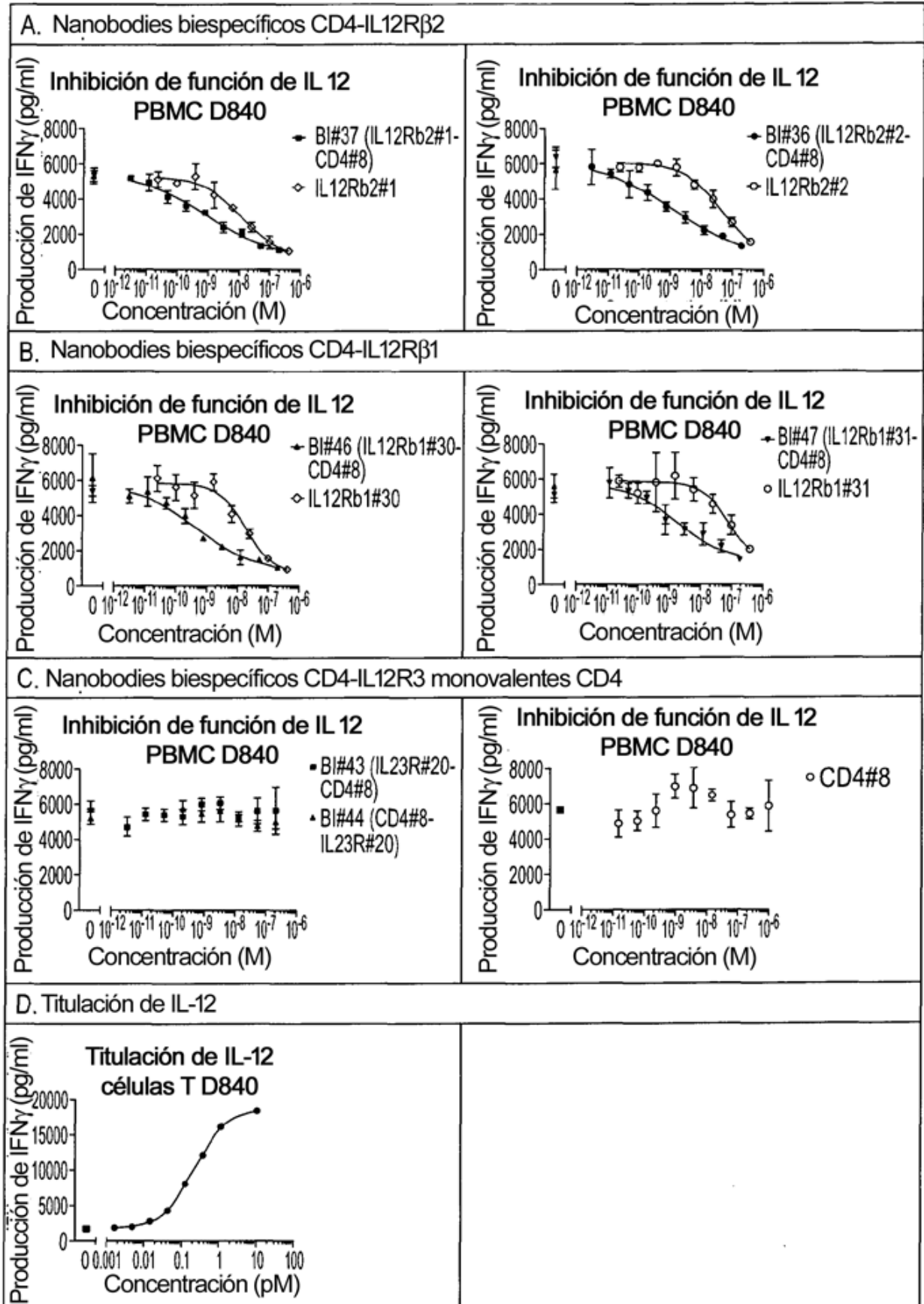


FIGURA 3.11

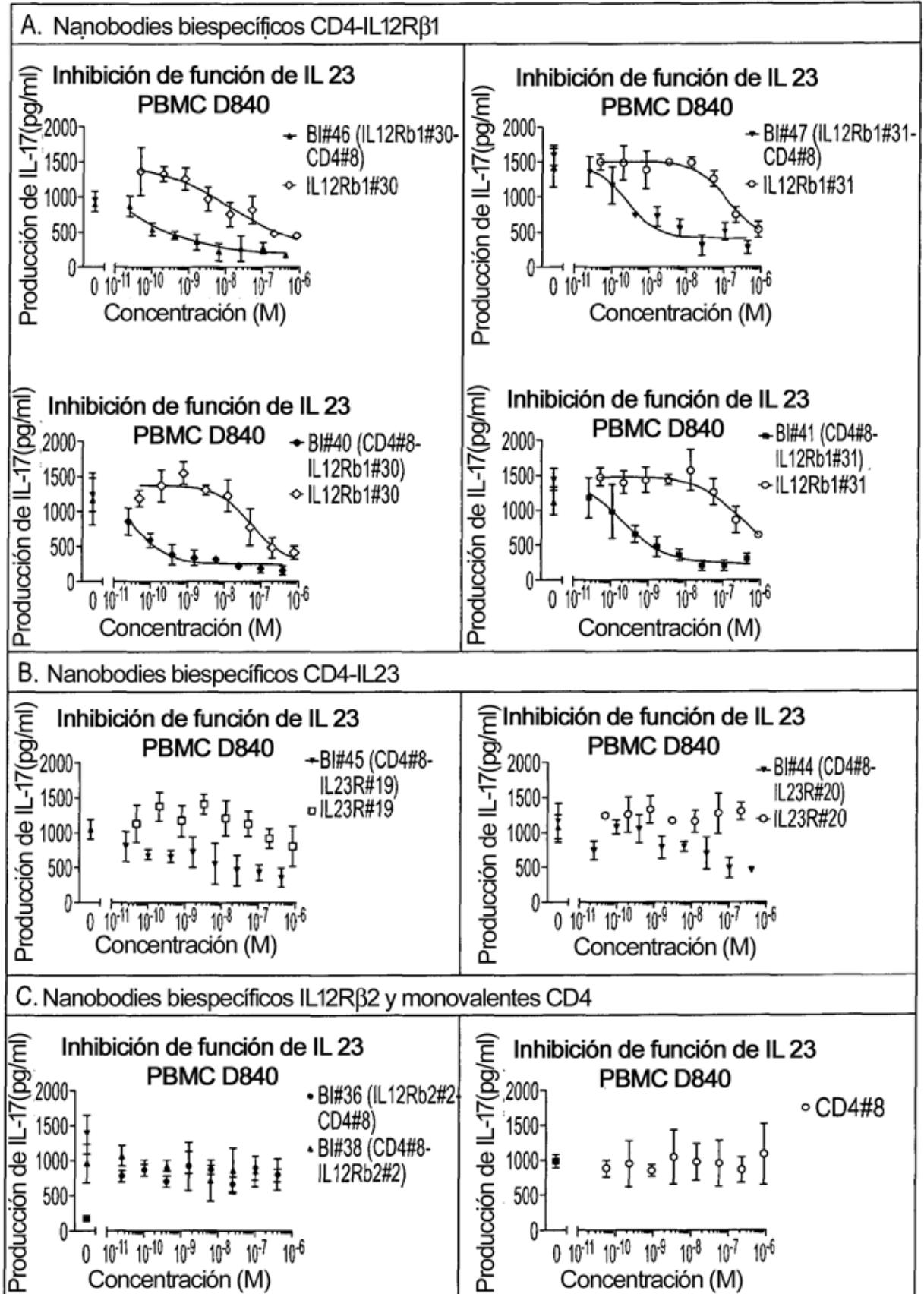


FIGURA 4.1

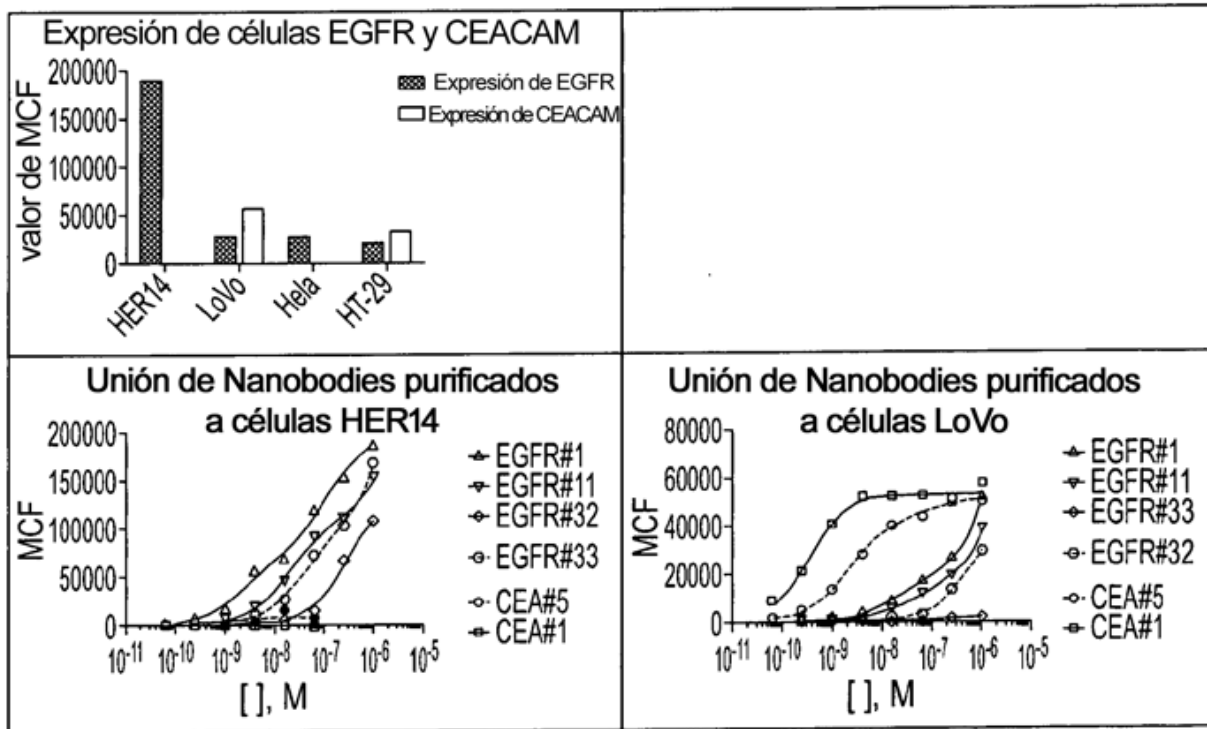


FIGURA 4.2

	extremo C-terminal		
extremo N-terminal	CEA#1	CEA#5	EGFR#1
EGFR#1	BI#26	BI#27	BI#52
EGFR#11	BI#22	BI#24	BI#49
EGFR#32	BI#23	BI#25	BI#50
EGFR#33	BI#34	BI#35	BI#53
CEA#1			BI#28
CEA#5			BI#29
			BI#51

FIGURA 4.3

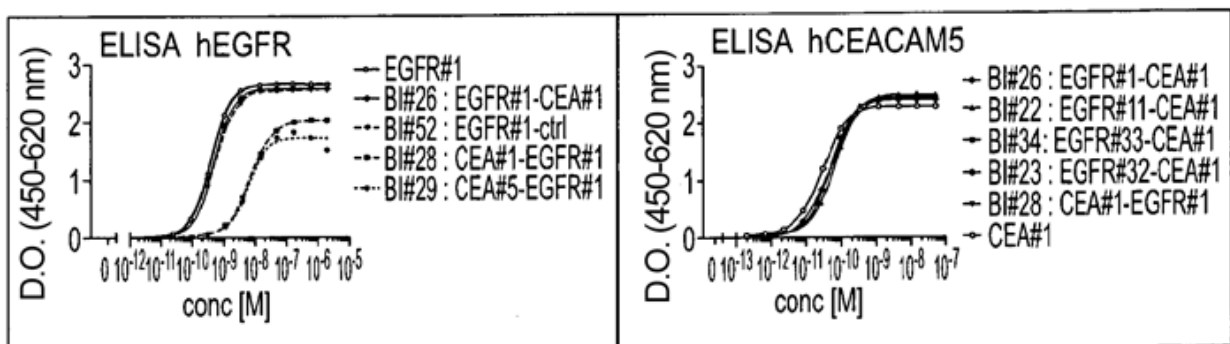
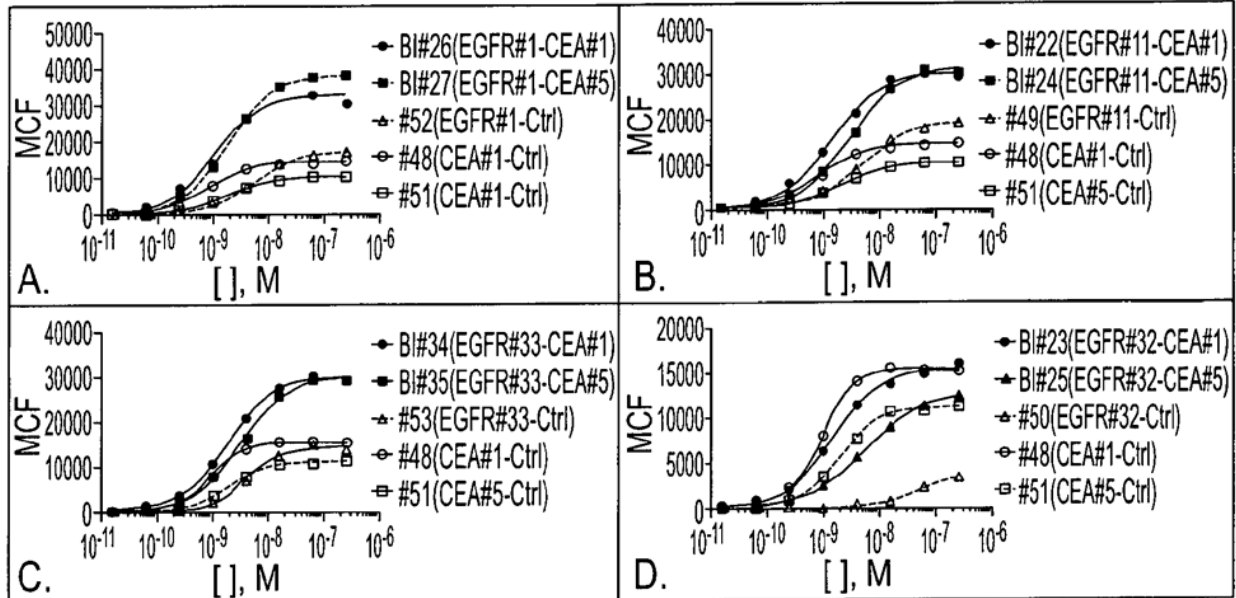


FIGURA 4.4

Unión de FACS en LoVo (EGFR+/CEACAM5-)



Unión de FACS en células HeLa y HER14

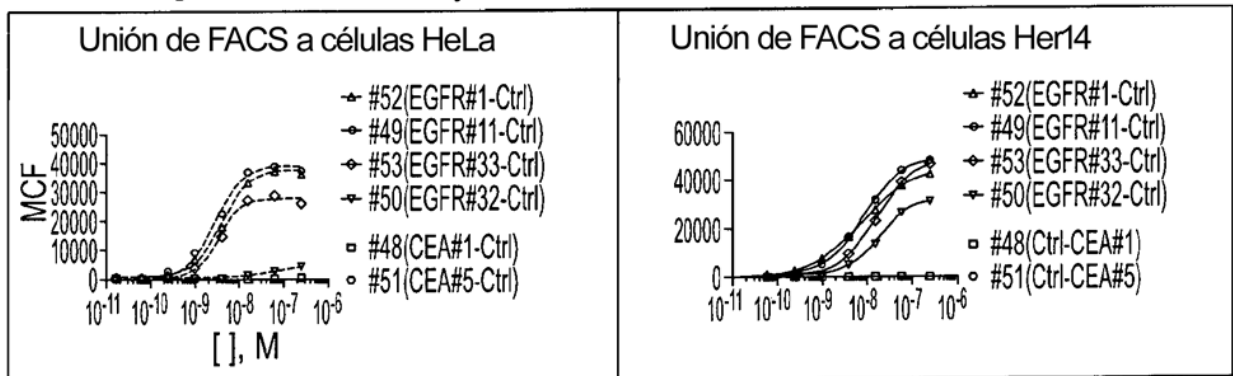


FIGURA 4.5

