



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 602**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02748987 .1**

(96) Fecha de presentación : **28.06.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1399484**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

(54) Título: **Ligando de doble especificidad y su uso.**

(30) Prioridad: **28.06.2001 GB 0115841**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2010

(73) Titular/es: **DOMANTIS LIMITED**
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB

(72) Inventor/es: **Tomlinson, Ian;**
Winter, Greg y
Ignatovich, Olga

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 348 602 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

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar ligandos de doble especificidad que comprenden una primera región de dominio variable único de inmunoglobulina que se une a un primer antígeno o epítipo, y una segunda región de dominio variable único de inmunoglobulina complementaria que se une a un segundo antígeno o epítipo. También se describen los ligandos de doble especificidad y sus usos.

Introducción

El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo comprende dos regiones separadas: un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L : que puede ser V_K o V_λ). El propio sitio de unión al antígeno está formado por 6 bucles polipeptídicos: 3 de dominio V_H (H1, H2 y H3) y 3 de dominio V_L (L1, L2 y L3). Mediante la reordenación combinatoria de segmentos de genes se produce un repertorio principal diverso de genes de V que codifican los dominios V_H y V_L . El gen de V_H se produce por recombinación de 3 segmentos de genes, V_H , D y J_H . En los seres humanos hay aproximadamente 51 segmentos V_H funcionales (Cook y Tomlinson (1995) *Immunol. Today*, 16: 237), 25 segmentos D funcionales (Corbett y col. (1997) *J. Mol. Biol.*, 268: 69) y 6 segmentos J_H funcionales (Ravetch y col. (1981) *Cell*, 27: 583), dependiendo del halotipo. El segmento V_H codifica la región de la cadena de polipéptido que forma el primer y segundo bucles de unión al antígeno del dominio V_H (H1 y H2), mientras que los segmentos V_H , D y J_H se combinan para formar el tercer bucle de unión al antígeno del dominio V_H (H3). El gen de V_L se produce por la recombinación de solo dos segmentos de genes, V_L y J_L . En los seres humanos, hay aproximadamente 40 segmentos V_K funcionales (Schäble y Zachau (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374: 1001), 31 segmentos V_λ funcionales (Williams y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220; Kawasaki y col. (1997) *Genome Res.*, 7: 250), 5 segmentos J_K funcionales (Hieter y col. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257: 1516) y 4 segmentos J_λ funcionales (Vasicek y Leder (1990) *J. Exp. Med.*, 172: 609), dependiendo del halotipo. El segmento V_L codifica la región de la cadena de polipéptido que forma el primer y segundo bucles de unión al antígeno del dominio V_L (L1 y L2), mientras que los segmentos V_L y J_L se combinan para formar el tercer bucle de unión al antígeno del dominio V_L (L3). Se cree que los anticuerpos seleccionados de este repertorio principal son suficientemente diversos para unirse a prácticamente todos los antígenos con una afinidad al menos moderada. Los anticuerpos de alta afinidad se producen por "maduración de afinidad" de genes reordenados, en los que se generan mutaciones puntuales y son seleccionadas por el sistema inmunitario basándose en la unión mejorada.

El análisis de las estructuras y secuencias de anticuerpos ha mostrado que 5 de los 6 bucles de unión al antígeno (H1, H2, L1, L2, L3) tienen un número limitado de conformaciones

de la cadena principal o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901; Chothia y col. (1989) *Nature*, 342: 877). Las conformaciones de la cadena principal se determinan por (i) la longitud del bucle de unión al antígeno, y (ii) restos particulares, o tipos de restos, en determinadas posiciones clave en el bucle de unión al antígeno y el marco conservado del anticuerpo. El análisis de las longitudes de los bucles y los restos clave ha permitido a los autores de la invención predecir las conformaciones de las cadenas principales de H1, H2, L1, L2 y L3 codificadas por la mayoría de las secuencias de anticuerpos humanos (Chothia y col. (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinson y col. (1995) *EMBO J.*, 14: 4628; Williams y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en términos de secuencia, longitud y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de confirmaciones de la cadena principal para longitudes de bucle cortas que dependen de la longitud y la presencia de restos particulares, o de tipos de restos, en posiciones clave en el bucle y el marco conservado del anticuerpo (Martin y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai y col. (1996) *FEBS Letters*, 399: 1.

Se conocen en la técnica anticuerpos biespecíficos que comprenden parejas complementarias de las regiones VH y VL. Estos anticuerpos biespecíficos deben comprender dos parejas de VH y VL, uniéndose cada pareja de VH/VL a un solo antígeno o epítipo. Los procedimientos descritos implican hibridomas híbridos (Milstein y Cuello AC, *Nature* 305:537-40), minianticuerpos (Hu y col., (1996) *Cancer Res* 56:3055-3061), fragmentos bivalentes (Holliger y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-6448; documento WO 94/13804), anticuerpos recombinantes quelantes (CRABs; (Neri y col., (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 367-373), biscFv (p. ej., Atwell y col., (1996) *Mol. Immunol.* 33, 1301-1312), anticuerpos estabilizados de "botón en ojal" (Carter y col., (1997) *Protein Sci.* 6, 781-788). En cada caso, cada especie de anticuerpo comprende dos sitios de unión al antígeno, cada uno formado por una pareja complementaria de dominios VH y VL. De esta forma, cada anticuerpo se puede unir a dos antígenos o epítopos diferentes al mismo tiempo, con la unión a cada antígeno o epítipo mediada por un dominio VH y su complementario VL. Cada una de estas técnicas presenta sus desventajas particulares; por ejemplo, en el caso de los hibridomas híbridos, las parejas VH/VL inactivas pueden reducir mucho la fracción de IgG biespecífica. Además, la mayoría de los procedimientos biespecíficos se basan en la asociación de diferentes parejas VH/VL o la asociación de cadenas de VH y VL para recrear los dos sitios de unión de VH/VL diferentes. Por lo tanto es imposible controlar la relación de sitios de unión a cada antígeno o epítipo en la molécula ensamblada y por lo tanto, muchas de las moléculas ensambladas se unirán a un antígeno o epítipo pero no al otro. En algunos casos ha sido posible diseñar las cadenas pesada o ligera en las interfases de subunidades (Carter y col., 1997) con el fin de mejorar el

número de moléculas que tienen sitios de unión a ambos antígenos o epítomos, pero esto nunca da como resultado todas las moléculas que tienen unión a ambos antígenos o epítomos.

Existen algunas pruebas de que se pueden incorporar dos especificidades de unión de anticuerpos en el mismo sitio de unión, pero esto generalmente representa dos o más especificidades que corresponden a antígenos o epítomos estructuralmente relacionados, o a anticuerpos que tienen reactividad cruzada amplia. Por ejemplo, se han descrito anticuerpos de reactividad cruzada, normalmente cuando los dos antígenos tienen secuencia y estructura relacionadas, tales como la lisozima de clara de huevo de gallina y la lisozima de pavo (McCafferty y col., documento WO 92/01047) o el hapteno libre y el hapteno conjugado con vehículo (Griffiths AD y col. *EMBO J.* 1994 13:14 3245-60). En un ejemplo adicional, el documento WO 02/02773 (Abbott Laboratories), publicado después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, describe moléculas de anticuerpo con “especificidad doble”. Las moléculas de anticuerpo a las que se hace referencia son anticuerpos preparados o seleccionados contra antígenos múltiples, de modo que su especificidad se extiende más que un solo antígeno. Cada pareja complementaria V_H/V_L en los anticuerpos del documento WO 02/02773 especifica una sola especificidad de unión para dos o más antígenos estructuralmente relacionados; los dominios V_H y V_L en dichas parejas complementarias no tienen cada una, una especificidad separada. Por lo tanto, los anticuerpos tienen una extensa especificidad única que abarca dos antígenos, que están estructuralmente relacionados. Además, se ha descrito que los autoanticuerpos naturales son polirreactivos (Casali y Notkins, *Ann. Rev. Immunol.* 7, 515-531), reaccionando con al menos dos (normalmente más) antígenos o epítomos diferentes que no están estructuralmente relacionados. También se ha mostrado que las selecciones de repertorios de péptidos aleatorios usando la tecnología de presentación en fagos de un anticuerpo monoclonal, identificará una variedad de secuencias de péptidos que se ajustan al sitio de unión al antígeno. Algunas de las secuencias están muy relacionadas, ajustándose a una secuencia consenso, mientras que otras son muy diferentes y se han denominado mimotopos (Lane y Stephen, *Current Opinion in Immunology*, 1993, 5, 268-271). Por lo tanto, está claro que el sitio de unión de un anticuerpo, que comprende los dominios V_H y V_L asociados y complementarios, tiene el potencial de unirse a muchos antígenos diferentes de un gran universo de antígenos conocidos. Está menos claro cómo crear un sitio de unión a dos antígenos dados, en particular a aquellos que no están estructuralmente relacionados.

Se ha sugerido que los procedimientos de diseño de proteínas pueden tener un apoyo en esto. Por ejemplo, también se ha propuesto que se podría crear un anticuerpo catalítico con una actividad de unión a un ion metálico a través de un dominio variable, y a un hapteno

(sustrato) a través de contactos con el ion metálico y un dominio variable complementario (Barbas y col., 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90, 6385-6389). Sin embargo, en este caso, se propone que la unión y la catálisis del sustrato (primer antígeno) requiera la unión al ion metálico (segundo antígeno). Por lo tanto, la unión a la pareja VH/VL se refiere a un solo antígeno pero multicomponente.

Se han descrito procedimientos para la creación de anticuerpos biespecíficos a partir de dominios únicos de cadena pesada de anticuerpo de camello en los que se crean contactos de unión para un antígeno en un dominio variable, y para un segundo antígeno en un segundo dominio variable. Sin embargo, los dominios variables no eran complementarios. Por lo tanto, se selecciona un primer dominio variable de cadena pesada contra un primer antígeno, y un segundo dominio variable de cadena pesada contra un segundo antígeno, y después ambos dominios se conectan entre sí en la misma cadena para dar un fragmento de anticuerpo biespecífico (Conrath y col., *J. Biol. Chem.* 270, 27589-27594). Sin embargo, los dominios únicos de cadena pesada de camello son raros en cuanto que derivan de anticuerpos de camello naturales que no tienen cadenas ligeras, y realmente los dominios únicos de cadena pesada no se pueden asociar con cadenas ligeras de camello para formar parejas de VH y VL complementarias.

También se han descrito dominios variables únicos de cadena pesada, derivados de anticuerpos naturales que normalmente se asocian con cadenas ligeras (de anticuerpos monoclonales o de repertorios de dominios, documentos EP-A-0368684). Se ha sugerido hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos por unión entre sí de dominios variables de cadena pesada de diferente especificidad (como se ha descrito antes). La desventaja de este procedimiento es que los dominios variables de anticuerpo aislados pueden tener una interfase hidrófoba que normalmente crea interacciones con la cadena ligera y está expuesta al disolvente y puede ser “pegajosa” dejando al dominio único unirse a superficies hidrófobas. Además, en este caso los dominios variables de cadena pesada no estarían asociados con dominios variables de cadena ligera complementarios y por lo tanto pueden ser menos estables y desplegarse fácilmente (Worn y Pluckthun, 1998 *Biochemistry* 37, 13120-7).

Resumen de la invención

Los autores de la invención se dieron cuenta de que es conveniente preparar anticuerpos biespecíficos en los que la unión de un primer antígeno o epítipo no facilite necesariamente la unión de un segundo antígeno o epítipo. También se dieron cuenta de que la solución está en crear contactos de unión para el primer antígeno o epítipo en un dominio variable, y contactos de unión para el segundo antígeno o epítipo en otro dominio variable, seleccionándose los dominios de modo que sean mutuamente complementarios, y que se

pueden obtener más ventajas significativas frente a los anticuerpos biespecíficos de la técnica anterior, al poner juntos dominios variables únicos complementarios de diferentes especificidades; por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada que se une a un primer antígeno o epítipo con un dominio variable de cadena ligera que se une a un segundo antígeno o epítipo. Por lo tanto cada pareja VH/VL tiene dos especificidades de unión. Estas combinaciones de dominios se denominan ligandos de “doble especificidad”.

Los autores de la invención han encontrado que el uso de dominios variables complementarios permite empaquetarse juntas las dos superficies de los dominios y secuestrarlas del disolvente. Además, los dominios complementarios pueden estabilizarse entre sí. Además, permite la creación de anticuerpos IgG de doble especificidad sin las desventajas de los hibridomas híbridos previamente discutidos, o la necesidad de diseñar cadenas pesadas o ligeras en las interfases de de las subunidades. Los ligandos de doble especificidad de la presente invención tienen al menos una pareja VH/VL. Una IgG biespecífica según esta invención comprenderá, por lo tanto, dos de dichas parejas, una pareja en cada brazo de la molécula en forma de Y. Por lo tanto, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos o fragmentos bivalentes convencionales en los que la relación de cadenas usada es determinante en el éxito de su preparación y conduce a dificultades prácticas, los ligandos de doble especificidad de la invención no tienen problemas de equilibrio de cadenas. El desequilibrio de las cadenas en los anticuerpos biespecíficos convencionales es resultado de la asociación de dos cadenas VL diferentes con dos cadenas VH diferentes, en las que la cadena VL 1 junto con la cadena VH 1 puede unirse al antígeno o epítipo 1 y la cadena VL 2 junto con la cadena VH2 puede unirse al antígeno o epítipo 1 y las dos parejas correctas están de alguna forma unidas entre sí. Por lo tanto, solo cuando la cadena VL 1 se empareja con la cadena VH 1 y la cadena VL 2 se empareja con la cadena VH2 en una sola molécula, se crea la biespecificidad. Dichas moléculas biespecíficas se pueden crear de dos formas diferentes. Primero, se pueden crear por asociación de dos parejas VH/VL existentes que se une cada una a un antígeno o epítipo diferente (por ejemplo, en una IgG biespecífica). En este caso, las parejas VH/VL deben juntarse con una relación 1:1 con el fin de crear una población de moléculas todas las cuales sean biespecíficas. Esto no ocurre nunca (incluso cuando el dominio CH complementario se potencia mediante manipulación por “botón en ojal”) conduciendo a una mezcla de moléculas biespecíficas y moléculas que solo pueden unirse a un antígeno o epítipo pero no al otro. La segunda forma de crear un anticuerpo biespecífico es por la asociación simultánea de dos cadenas VH diferentes con dos cadenas VL diferentes (por ejemplo en un fragmento divalente biespecífico). En este caso, aunque tiende a haber una preferencia por que la cadena VL 1 empareje con la cadena VH 1 y la cadena VL 2 empareje

con la cadena VH 2 (lo cual se puede potenciar por manipulación por “botón en ojal” de los dominios VL y VH), este emparejamiento no se logra nunca en todas las moléculas, conduciendo a una formulación mixta por lo que se producen emparejamientos incorrectos que no son capaces de unirse ni al antígeno ni al epítipo.

5 Los anticuerpos biespecíficos contruidos según el procedimiento del ligando de doble especificidad según la presente invención, superan todos estos problemas porque la unión al antígeno o epítipo 1 reside en el dominio VH o VL y la unión al antígeno o epítipo 2 reside en el dominio VL o VH complementario, respectivamente. Puesto que los dominios VH y VL se emparejan en una base 1:1, todos las parejas VH/VL serán biespecíficas y por lo tanto todos
10 los formatos contruidos usando estas parejas VH/VL (Fv, scFv, Fab, minianticuerpos, IgG, etc.) tendrán actividad 100% biespecífica.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un ligando de doble especificidad que comprende un primer dominio variable único de inmunoglobulina que tiene una primera especificidad de unión y un dominio variable
15 único de inmunoglobulina complementario que tiene una segunda especificidad de unión, en el que los dominios variable se unen a sus respectivos antígenos o epítopos simultáneamente, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) seleccionar un primer dominio variable por su capacidad para unirse a un primer epítipo,
- 20 (b) seleccionar una segunda región variable por su capacidad para unirse a un segundo epítipo,
- (c) combinar las regiones variables; y
- (d) seleccionar el ligando de doble especificidad por su capacidad para unirse a dichos primer y segundo epítopos.

25 En el contexto de la presente invención, se entiende que el primer y segundo “epítopos” son epítopos que no son iguales y no están unidos por un solo ligando monoespecífico. Pueden estar en diferentes antígenos o en el mismo antígeno, pero separados por una distancia suficiente de modo que no formen una sola entidad que podría unirse a una sola pareja de unión V_H/V_L monoespecífica de un anticuerpo convencional. Experimentalmente, si
30 los dos dominios variables individuales en forma de anticuerpo de una cadena (anticuerpos de un dominio o dAb) compiten por separado por un ligando V_H/V_L monoespecífico contra dos epítopos, entonces estos dos epítopos no están suficientemente separados para considerarse epítopos separados según la presente invención.

Los ligandos de doble especificidad de la invención no incluyen los ligandos descritos
35 en el documento WO 02/02773. Por lo tanto, los ligandos de la presente invención no

comprenden parejas V_H/V_L complementarias que se unen a uno cualquier o más antígenos o epítomos de forma cooperativa. En su lugar, los ligandos según la invención comprenden una pareja V_H/V_L complementaria, en la que los dominios V tienen diferentes especificidades.

Además, los ligandos según la invención comprenden parejas complementarias V_H/V_L que tienen diferentes especificidades para epítomos o antígenos estructuralmente no relacionados. Los epítomos o antígenos estructuralmente relacionados son epítomos o antígenos que tienen suficiente similitud estructural para unirse a una pareja complementaria V_H/V_L convencional que actúa de una forma cooperativa para unir un antígeno o epítomo; en el caso de epítomos estructuralmente relacionados, los epítomos son suficientemente similares en estructura de modo que “encajan” en el mismo bolsillo de unión formado en el sitio de unión al antígeno del dímero V_H/V_L .

En una realización preferida de la invención, se puede seleccionar cada dominio variable único para la unión a su antígeno o epítomo objetivo en ausencia de una región variable complementaria. En una realización alternativa, los dominios variables únicos se pueden seleccionar para la unión a su antígeno o epítomo objetivo en presencia de una región variable complementaria. Así, el primer dominio variable único se puede seleccionar en presencia de un tercer dominio variable complementario, y el segundo dominio variable se puede seleccionar en presencia de un cuarto dominio variable complementario. En este caso la actividad de unión del primer (o segundo) dominio variable puede no ser evidente excepto en presencia del tercer (o cuarto) dominio variable complementario. El tercer o cuarto dominio variable complementario puede ser el dominio variable cognado natural que tiene la misma especificidad que el dominio único que se está analizando, o un dominio complementario no afín, tal como un dominio variable “simulado”.

Ventajosamente, los dominios variables únicos se obtienen de anticuerpos seleccionados por la actividad de unión contra diferentes antígenos o epítomos.

Preferiblemente, el ligando de doble especificidad de la invención comprende solo 2 dominios variables complementarios, aunque algunos de dichos ligandos se pueden incorporar juntos en la misma proteína, por ejemplo, dos de dichos ligandos se pueden incorporar en una IgG o una inmunoglobulina multimérica, tal como IgM. Alternativamente, en otra realización se combina una pluralidad de ligandos de doble especificidad para formar un multímero. Por ejemplo, se combinan dos ligandos de doble especificidad diferentes para crear una molécula tetraespecífica.

Los ligandos de doble especificidad se pueden combinar en estructuras multiligando que no son inmunoglobulinas, para formar complejos multivalentes que unen moléculas objetivo con mayor avidéz. En un ejemplo de dichos multímeros, las regiones V unen

diferentes epítomos en el mismo antígeno, proporcionando de esta forma una avidéz superior. En una realización, se pueden construir complejos multivalentes en proteínas armazón, como se describe en el documento WO0069907 (Medical Research Council), que se basan por ejemplo, en la estructura de anillo de la proteína GroEL bacteriana o en otros polipéptidos carabina.

El experto en la materia observará que las regiones variables ligera y pesada del ligando de doble especificidad producido según el procedimiento de la presente invención, pueden estar en la misma cadena de polipéptido, o alternativamente, en diferentes cadenas de polipéptido. En el caso de que las regiones variables estén en diferentes cadenas de polipéptido, entonces pueden estar unidas por un conector, en general un conector flexible (tal como una cadena de polipéptido), un grupo de conexión químico, o cualquier otro procedimiento conocido en la materia.

El primer y el segundo dominios de unión al antígeno pueden estar asociados de forma covalente o no covalente. En el caso de que los dominios estén asociados de forma covalente, entonces la asociación puede estar mediada, por ejemplo, por enlaces disulfuro.

El primer y el segundo antígeno o epítomos son diferentes. Pueden ser, o pueden ser parte de, polipéptidos, proteínas o ácidos nucleicos, que pueden ser naturales o sintéticos. Un experto en la materia apreciará que la elección es grande y variada. Pueden ser, por ejemplo, proteínas animales o humanas, citocinas, receptores de citocinas, cofactores enzimáticos para enzimas o proteínas de unión a ADN. Las citocinas y factores de crecimiento adecuados incluyen, pero sin limitar: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos-10 (30), ligando FLT3, fractalcina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 aa), IL-8 (77 aa), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), inhibina α , inhibina β , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, leptina, LIF, linfotactina, sustancia inhibidora mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atractora de monocitos (30, véase antes), M-CSF, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, factor inhibidor de progenitores mieloides-1 (MPL-1), NAP-2, neurturina, factor de crecimiento, β -NGF, NT-3, NT-4, oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF- α , TNF- β , TNF- β 2, TGF- β 3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , receptor de TNF I, receptor de TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor de VEGF 1, receptor de VEGF 2, receptor de VEGF 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3 y HER 4. Los receptores de

citocinas incluyen receptores para las citocinas anteriores. Se observará que esta lista no es de ningún modo exhaustiva. Cuando los ligandos de doble especificidad se unen a dos epítomos (en el mismo o diferentes antígenos), el o los antígenos se pueden seleccionar de esta lista.

5 En una realización de la invención, los dominios variables se obtienen de un anticuerpo dirigido contra el primer y/o segundo antígeno o epítomo. En una realización preferida, los dominios variables se obtienen de un repertorio de dominios variables únicos de anticuerpo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un ligando de doble especificidad según la reivindicación 1.

10 Ventajosamente, el ligando de doble especificidad según el segundo aspecto de la invención se obtiene por el procedimiento del primer aspecto de la invención.

En una realización, el ligando comprende un dominio variable único de cadena pesada de un anticuerpo y un dominio variable único de cadena ligera complementario de un anticuerpo, de modo que las dos regiones son capaces de asociarse para formar una pareja
15 de V_H/V_L complementaria.

Un ligando de doble especificidad de esta naturaleza permite que las dos superficies de regiones variables complementarias se empaqueten entre sí y sean secuestradas del disolvente, y ayuda a que se estabilicen entre sí.

Ventajosamente, el ligando de doble especificidad puede comprender un primer
20 dominio capaz de unirse a una molécula objetivo y un segundo dominio capaz de unirse a una molécula o grupo que prolonga la semivida del ligando. Por ejemplo, la molécula o grupo puede ser un agente de volumen, tal como HSA o una proteína de la matriz celular.

Así, por ejemplo, un ligando de doble especificidad se mantiene en la circulación en el torrente sanguíneo de un sujeto mediante una molécula de volumen tal como HSA. Cuando se
25 encuentra una molécula objetivo, la competencia entre los dominios de unión del ligando de doble especificidad da como resultado el desplazamiento del HSA y la unión del objetivo.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una o más moléculas de ácido nucleico que codifican al menos un ligando de doble especificidad como se define en el presente documento. El ligando de doble especificidad puede ser codificado por una sola
30 molécula de ácido nucleico; alternativamente, cada dominio complementario puede ser codificado por una molécula de ácido nucleico separada. Cuando el ligando es codificado por una sola molécula de ácido nucleico, los dominios complementarios pueden ser expresados como un polipéptido de fusión, en forma de una molécula scFV, o pueden ser expresados por separado y posteriormente unidos entre sí, por ejemplo usando agentes de unión químicos.

35 Los ligandos expresados por ácidos nucleicos distintos se unirán entre sí por medios

adecuados.

El ácido nucleico puede codificar además una secuencia señal para exportar los polipéptidos desde una célula huésped tras la expresión y se pueden fusionar con un componente de superficie de una partícula bacteriófaga filamentosa (u otro componente de un sistema de presentación de selección) tras la expresión.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico según la presente invención.

En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona una célula huésped transfectada con un vector según la presente invención.

La expresión a partir de dicho vector se puede configurar para producir, por ejemplo, en la superficie de una partícula bacteriófaga, dominios variables para la selección. Esto permite la selección de regiones variables presentadas y por lo tanto la selección de “ligandos de doble especificidad”, usando el procedimiento de la presente invención.

Se describe un kit que comprende al menos un ligando de doble especificidad según la presente invención.

Los ligandos de doble especificidad según la presente invención, comprenden combinaciones de dominios de cadena ligera y pesada. Por ejemplo, el ligando de doble especificidad puede comprender un dominio V_H y un dominio V_L , que pueden unirse entre sí en forma de un scFv. Además, los ligandos pueden comprender uno o más dominios C_H o C_L . Por ejemplo, los ligandos pueden comprender un dominio C_{H1} , C_{H2} o dominio C_{H3} , y/o un dominio C_L , dominios $C_{\mu 1}$, $C_{\mu 2}$, $C_{\mu 3}$ o $C_{\mu 4}$, o cualquier combinación de los mismos. También se puede incluir un dominio de región bisagra. Dichas combinaciones de dominios pueden imitar, por ejemplo, anticuerpos naturales, tales como IgG o IgM, o fragmentos de los mismos tales como moléculas Fv, scFv, Fab o $F(ab')_2$. Se contemplan otras estructuras, tales como un solo brazo de una molécula de IgG que comprende dominios V_H , V_L , C_{H1} y C_L .

En una realización preferida de la invención, las regiones variables se seleccionan de un repertorio de genes de dominio V único. En general, el repertorio de dominios únicos de anticuerpos se presenta en la superficie de bacteriófagos filamentosos. En una realización preferida, cada dominio único de anticuerpo se selecciona por la unión de un repertorio en fagos al antígeno.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de enfermedades usando un “ligando de doble especificidad” o una composición según la presente invención.

En una realización preferida de la invención la enfermedad es el cáncer. Por ejemplo, se puede usar un ligando de doble especificidad “puente” para reclutar células T citotóxicas

contra un marcador de cáncer, o para unir dos antígenos o epítopos diferentes en la superficie de una célula de cáncer, aumentado así la afinidad o especificidad de la unión a la superficie de la célula. Para una IgG completa compuesta de ligandos de doble especificidad puente, el anticuerpo será capaz de unirse a cuatro moléculas de antígeno o cuatro epítopos diferentes.

5 Alternativamente, si la unión de un antígeno o epítipo desplaza al otro, dichos anticuerpo se pueden usar para liberar un fármaco en la unión de un marcador de superficie e células de cáncer. Cuando el anticuerpo de doble especificidad es al menos divalente, tal como una IgG de doble especificidad, pueden suministrarse efectores múltiples a la misma célula, tal como un fármaco antitumoral y un marcador de linfocitos T citotóxicos.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico, que incluye el diagnóstico de enfermedades, usando un ligando de doble especificidad, o una composición según la presente invención. Por lo tanto, en general se puede explotar la unión de un analito a un ligando de doble especificidad para desplazar a un agente, lo cual conduce a la generación de una señal al producirse el desplazamiento. Por
15 ejemplo, la unión del analito (segundo antígeno) podría desplazar una enzima (primer antígeno) unida al anticuerpo proporcionando la base para un inmunoensayo, en especial si la enzima se mantuviera en el anticuerpo por su sitio activo.

Breve descripción de las figuras

20 Figura 1: muestra la diversificación de VH/HSA en las posiciones H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98 (codificados en DVT o NNK respectivamente) que están en el sitio de unión del antígeno de VH HSA. La secuencia de V_K está diversificada en las posiciones L50, L53.

Figura 2: muestra la Biblioteca 1: línea germinal V_K /DVT V_H , Biblioteca 2: línea germinal V_K /NNK V_H , Biblioteca 3: línea germinal V_H /DVT V_K , Biblioteca 4: línea germinal V_H /NNK V_K en
25 formato pIT2/ScFv. Estas bibliotecas se preseleccionaron para la unión a los ligandos genéricos proteína A y proteína L, de modo que la mayoría de los clones y bibliotecas seleccionadas son funcionales. Las bibliotecas se seleccionaron en HSA (primer ciclo) y β -gal (segundo ciclo), selección HSA/ β -gal, o en β -gal (primer ciclo) y HSA (segundo ciclo), selección β -gal/HSA. Se amplifica la secuencia de los scFv solubles de estos clones de la
30 PCR. Se eligió un clon que codificaba un anticuerpo de doble especificidad K8 para el trabajo posterior.

Figura 3: muestra un alineamiento de cadenas V_H y cadenas V_K .

Figura 4: muestra la caracterización de las propiedades de unión del anticuerpo K8, las propiedades de unión del anticuerpo K8 se caracterizaron por ELISA de fagos monoclonales,
35 se encontró que el anticuerpo K8 de doble especificidad se unía a HSA y β -gal, y se

presentaba en la superficie del fago con señales de absorbancia mayores de 1,0. No se detectó reactividad cruzada con otras proteínas.

Figura 5: muestra el ELISA de scFv soluble realizado usando concentraciones conocidas del fragmento de anticuerpo K8. Se recubrió una placa de 96 pocillos con 100 µg de HSA, BSA y β-gal 10 µg/ml y 100 µl de proteína A en una concentración de 1 µg/ml. Se aplicaron 50 µl de diluciones seriadas del scFv K8 y los fragmentos de anticuerpo unidos se detectaron con proteína L-HRP. Los resultados de ELISA confirman la naturaleza de doble especificidad del anticuerpo K8.

Figura 6: muestra las características de unión del clon KBV_K/VH simulado analizadas usando ELISA de scFv soluble. La producción de los fragmentos de scFv solubles se indujo mediante IPTG como describen Harrison y col., *Methods Enzymol.* 1996; 267:83-109 y se ensayó directamente el líquido sobrenadante que contenía los scFv. El ELISA de scFv soluble se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1, y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Los resultados del ELISA pusieron de manifiesto que este clon todavía era capaz de unirse a β-gal, mientras que se había abolido la unión a BSA.

Figura 7: muestra la unión de los anticuerpos scFv de doble especificidad dirigidos contra APS y β-gal y de un anticuerpo scFv de doble especificidad dirigido contra la proteína BCL10 y β-gal, a sus respectivos antígenos.

Figura 8: muestra las características de unión de K8V_K/V_H2/KBV_K/V_H4 y K8V_K/V_HC11 usando ELISA de scFv soluble como se describe en el presente documento. Todos los clones tenían doble especificidad sin ninguna reactividad cruzada con otras proteínas.

Figura 9: muestra las características de unión de los clones producidos V_H2sd y V_H4sd analizadas por ELISA de fago monoclonal. Se produjeron partículas de fago como describieron Harrison y col. en 1996. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos con 100 µg/ml de APS, BSA, HSA, β-gal, ubiquitina, α-amilasa y miosina con una concentración de 10 µg/ml en PBS durante la noche a 4 °C. Se siguió un protocolo de ELISA estándar usando la detección de fago unido con el conjugado anti-M13-HRP. Los resultados del ELISA demostraron que los dominios V_H únicos reconocían específicamente la APS cuando se presentaba en la superficie del bacteriófago filamentoso.

Figura 10: muestra el ELISA de V_H2sd y V_H4sd solubles. Se obtienen los mismos resultados que con el ELISA de fago mostrado en la figura 9, lo que indica que estos dominios únicos también pueden reconocer la APS o fragmentos solubles.

Figura 11: muestra la selección de los anticuerpos de dominio V_H único dirigidos contra la APS y los anticuerpos de dominio V_K único dirigidos contra la β-gal de un repertorio de dominios únicos de anticuerpos. Se llevó a cabo el ELISA del dominio único soluble como el

ELISA de scFv soluble descrito en el ejemplo 1 y se detectaron los dominios únicos V_k y V_H unidos con Proteína L-HRP y Proteína A-HRP, respectivamente. Se encontró que 5 dominios V_H únicos V_{HA10sd} , V_{HA1sd} , V_{HA5sd} , V_{HC5sd} y V_{HC11sd} seleccionados de la biblioteca 5 se unían a la APS y se encontró que un dominio V_k único V_{KE5SD} seleccionado de la biblioteca 6 se unía a la β -gal. Ninguno de los clones tenía reactividad cruzada con la BSA.

Figura 12: muestra la caracterización de los anticuerpos scFv de doble especificidad V_{KE5}/V_{H2} y V_{KE5}/V_{H4} dirigidos contra la APS y β -gal. Se llevó a cabo el ELISA de scFv soluble como se ha descrito en el ejemplo 1, y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Se encontró que tanto los clones V_{KE5}/V_{H2} como V_{KE5}/V_{H4} tenían especificidad doble. No se detectó reactividad cruzada con la BSA.

Figura 13: muestra la construcción del vector V_k y el vector V_{kG3} . V_{kG} se amplificó por PCR a partir de un clon individual, A4, seleccionado de una biblioteca de Fab usando BK BACKNOT como un cebador inverso 5' y CKSACFORFL como un cebador 3' (directo). Se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación de la PCR excepto que se usó la polimerasa *Pfu* como enzima. El producto de la PCR se digirió con *NotI/EcoRI* y se ligó en un vector pHEN14 V_k digerido con *NotI/EcoRI* para crear un vector C_k .

Figura 14: muestra el vector C_k al que se hace referencia en la figura 13.

Figura 15: muestra un fagémido $C_k/gIII$. El gen III se amplificó por la PCR a partir de un vector pIT2 usando G3BACKSAC como un cebador 5' (inverso) y LMB2 como un cebador 3' (directo). Se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación por la PCR como se describe en el presente documento. El producto de la PCR se digirió con *SAC/EcoRI* y se ligó en un vector C_k digerido con *SacI/EcoRI*.

Figura 16: muestra un vector C_H . El gen de C_H se amplificó por la PCR a partir de un clon individual A4 seleccionado de una biblioteca de Fab usando CHBACKNOT como un cebador 5' (inverso) y CHSACFOR como un cebador 3' (directo). Se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación por la PCR como se describe en el presente documento. El producto de la PCR se digirió con *NotI/BglII* y se ligó a un vector PACYC4 V_H digerido con *NotI/BglII* para crear un vector C_H .

Figura 17: muestra el vector C_H al que se hace referencia en la figura 16.

Figura 18: muestra un ELISA de Fab V_{KE5}/V_{H2} .

Figura 19: muestra los ELISA competitivos de scFv V_{KE5}/V_{H2} y Fab V_{KE5}/V_{H2} .

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Complementario. Dos dominios de inmunoglobulina son “complementarios” cuando pertenecen a familias de estructuras que forman parejas o grupos relacionados o derivan de

dichas familias y retienen dicha característica. Por ejemplo, un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo son complementarios; dos dominios V_H no son complementarios; y dos dominios V_L no son complementarios. Se pueden encontrar dominios complementarios en otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, tales como los dominios V_α (o γ y δ) del receptor de células T. En el contexto de la presente invención, los dominios complementarios no se unen a una molécula objetivo de forma cooperativa, sino que actúan independientemente en diferentes epítomos objetivos que pueden estar en la misma o en diferentes moléculas.

Inmunoglobulina. Esto se refiere a una familia de polipéptidos que retienen la característica de plegado de la inmunoglobulina de las moléculas de anticuerpo, que contienen dos láminas β y, normalmente, un enlace disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas están implicados en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares in vivo, incluyendo funciones ampliamente extendidas en el sistema inmunitario (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de células T y similares), implicación en la adhesión celular (por ejemplo, las moléculas de ICAM) y señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como receptor del PDGF). La presente invención se puede aplicar a todas las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas que tienen dominios complementarios. Preferiblemente, la presente invención se refiere a anticuerpos.

Combinar. Los dominios variables complementarios según la invención se combinan para formar un grupo de dominios complementarios; por ejemplo, los dominios V_L se combinan con dominios V_H . Los dominios se pueden combinar en una serie de formas, que implican la unión de los dominios por medios covalentes y no covalentes.

Dominio. Un dominio es una estructura de proteína plegada que retiene su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos casos se pueden añadir, eliminar o transferir a otras proteínas sin pérdida de la función del resto de la proteína y/o del dominio. Por dominio variable único de anticuerpo se entiende un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables del anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables completos del anticuerpo y dominios variables modificados, en los que, por ejemplo, uno o más bucles se han sustituido por secuencias que no son características de los dominios variables del anticuerpo, o dominios variables del anticuerpo que se han truncado o comprenden extensiones N o C-terminales, así como fragmentos plegados de dominios variables que retienen al menos en parte la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

Repertorio. Una colección de variantes diferentes, por ejemplo variantes de polipéptidos que difieren en su secuencia primaria. Una biblioteca usada en la presente invención abarcará un repertorio de polipéptidos que comprende al menos 1000 miembros.

Biblioteca. El término biblioteca se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca está compuesta de miembros que tienen una secuencia única de ácido nucleico o polipéptido. En este punto, *biblioteca* es sinónimo de *repertorio*. Las diferencias de secuencia entre miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tener la forma de una simple mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo, bacterias, virus, células de animales o plantas y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene solo uno o un número limitado de miembros de la biblioteca. Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. Por lo tanto, en un aspecto preferido, una biblioteca puede tener la forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un solo miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico, que se puede expresar para producir el correspondiente miembro polipéptido. Por lo tanto, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un repertorio grande de variantes de polipéptidos genéticamente diversos.

Anticuerpo. Un anticuerpo (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE) o fragmento (tal como un Fab, F(Ab')₂, Fv unido por disulfuro, scFv, scFv unido por disulfuro, fragmento bivalente), sea obtenido de cualquier especie que produce naturalmente un anticuerpo, o sea creado por tecnología de ADN recombinante; sea aislado de suero, células B, hibridomas, transfectomas, levadura o bacterias).

Ligando de doble especificidad. Un ligando comprende un primer dominio variable único de inmunoglobulina y un segundo dominio variable único de inmunoglobulina como se define en el presente documento, en el que las regiones variables son capaces de unirse a dos antígenos o dos epítomos diferentes en el mismo antígeno, a los que normalmente no se une una inmunoglobulina monoespecífica. Por ejemplo, los dos epítomos pueden estar en el mismo hapteno, pero no son el mismo epítomo, o estar suficientemente adyacentes para unirse un ligando monoespecífico. Los ligandos de doble especificidad según la invención, están compuestos de parejas de dominios variables mutuamente complementarios que tienen diferentes especificidades, y no contienen parejas de dominios variables complementarios que tengan la misma especificidad.

Antígeno. Un ligando que se une a una pequeña fracción de miembros de un

repertorio según la presente invención. Puede ser un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula. En general, los ligandos de doble especificidad de la invención se seleccionan según la especificidad objetivo contra un antígeno particular. En el caso de anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos, el sitio de unión del anticuerpo definido por los bucles variables (L1, L2, L3 y H1, H2, H3) es capaz de unirse al antígeno.

Epítopo. Una unidad de estructura unida convencionalmente por una pareja de V_H/V_L de inmunoglobulina. Los epítopos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo, y por lo tanto representan el objetivo de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio único, un epítopo representa la unidad de estructura unida por un dominio variable en forma aislada.

Ligando genérico específico. Un ligando que se une a todos los miembros de un repertorio. En general, no unido por el sitio de unión al antígeno como se ha definido antes. Los ejemplos incluyen la proteína A y proteína L.

Selección. Obtenida por cribado u obtenida por un procedimiento de selección Darwiniano, en el que las interacciones de unión se hacen entre un dominio y el antígeno o epítopo, o entre un anticuerpo y un antígeno o epítopo. Por lo tanto, se puede seleccionar un primer dominio variable para la unión a un antígeno o epítopo en presencia o en ausencia de un dominio variable complementario.

Marco conservado universal. Una secuencia de región de armazón única de anticuerpo que corresponde a las regiones de un anticuerpo de secuencia conservada como define Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services) o que corresponde al repertorio de inmunoglobulinas de línea germinal humana como definen Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 910-917. La invención proporciona el uso de un marco conservado único, o un conjunto de dichos marcos conservados, que se ha encontrado que permiten la obtención de casi cualquier especificidad de unión por variación solo en las regiones hipervariables.

Descripción detallada de la invención

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente el experto en la materia (p. ej., en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas estándar para los procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase en general, Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel y col., "Short Protocols in Molecular Biology" (1999), 4ª Ed., John Wiley & Sons, Inc., que se incorporan en el presente documento por referencia) y procedimientos químicos.

Los ligandos de doble especificidad según la invención, se pueden preparar según técnicas previamente establecidas, usadas en el campo de la ingeniería de anticuerpos para preparar anticuerpos scFv, "fago" y otras moléculas de anticuerpo modificadas por ingeniería. Las técnicas para la preparación de anticuerpos, y en particular de anticuerpos biespecíficos, se describen por ejemplo en las siguientes revisiones y las referencias citadas en las mismas: Winter & Milstein, (1991) *Nature* 349:293-299; Plueckthun (1992) *Immunological Reviews* 130:151-188; Wright y col., (1992) *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-168; Holliger, P. y Winter, G. (1993) *Curr. Op. Biotechn.* 4, 446-449; Carter, y col. (1995) *J. Hematother.* 4, 463-470; Chester, K.A. & Hawkins, R.E. (1995) *Trends Biotechn.* 13, 294-300; Hoogenboom, H.R (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 125-126; Fearon, D. (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 618-619; Plückthun, A. y Pack, P. (1997) *Immunotechnology* 3, 83-105; Carter, P. y Merchant, A.M. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 449-454; Holliger, P. y Winter, G. (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* 45,128-130.

La invención como se define en las reivindicaciones proporciona la selección de dominios variables complementarios contra dos antígenos o epítomos diferentes, y la posterior combinación de los dominios variables.

Las técnicas usadas para la selección de dominios variables usan bibliotecas y procedimientos de selección que son conocidos en la materia. Las bibliotecas naturales (Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Vaughan y col. (1996) *Nature Biotech.*, 14: 309) que usan genes de V reordenados recogidos de células B humanas son conocidos para los expertos en la materia. Las bibliotecas sintéticas (Hoogenboom y Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457; Nissim y col. (1994) *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths y col. (1994) *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruif y col. (1995) *J. Mol. Biol.*, 248: 97) se preparan por clonación de genes de V de inmunoglobulina, usando normalmente la PCR. Los errores en el procedimiento de la PCR pueden conducir a un alto grado de aleatorización. Las bibliotecas de V_H y/o V_L se pueden seleccionar contra antígenos diana o epítomos por separado, en cuyo caso se selecciona directamente para la unión al dominio único, o juntos.

Un procedimiento preferido para hacer un ligando de doble especificidad según la presente invención, comprende usar un sistema de selección en el que se selecciona en un repertorio de dominios variables la unión a un primer antígeno o epítomo y se selecciona en un repertorio de dominios variables la unión a un segundo antígeno o epítomo. El primer y segundo dominios variables seleccionados después se combinan y se selecciona la doble especificidad para la unión tanto al primero como al segundo antígeno o epítomo.

A. Sistemas de bibliotecas de vectores

Se conoce una variedad de sistemas de selección en la técnica que son adecuados

para usar en la presente invención. Se describen a continuación ejemplos de dichos sistemas.

Los sistemas de expresión de bacteriófagos lambda se pueden cribar directamente como placas de bacteriófagos o como colonias de lisógenos, ambos como se ha descrito previamente (Huse y col. (1989) *Science*, 246: 1275; Caton and Koprowski (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 8095; Persson y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 2432) y son útiles en la invención. Aunque dichos sistemas de expresión se pueden usar para cribar hasta 10^6 miembros diferentes de una biblioteca, no son realmente adecuados para cribar cantidades mayores (más de 10^6 miembros).

Tienen utilidad particular en la construcción de bibliotecas son los sistemas de selección de presentación, que permiten que un ácido nucleico se una al polipéptido que expresa. Como se usa en el presente documento, un sistema de selección de presentación es un sistema que permite la selección, por medios de presentación adecuados, de los miembros individuales de la biblioteca por unión de los ligandos genéricos y/u objetivos.

Los protocolos de selección para aislar los miembros deseados de bibliotecas grandes son conocidos en la materia, como se ilustra con las técnicas de presentación en fagos. Dichos sistemas en los que se presentan secuencias de péptidos diversas en la superficie de bacteriófagos filamentosos (Scott y Smith (1990) *Science*, 249: 386), han demostrado ser útiles para crear bibliotecas de fragmentos de anticuerpos (y las secuencias de nucleótidos que los codifican) para la selección in vitro y amplificación de fragmentos de anticuerpos específicos que unen un antígeno objetivo (McCafferty y col., documento WO 92/01047). Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones V_H y V_L están unidas a fragmentos de genes que codifican señales líder que los dirigen al espacio periplásmico de *E. coli* y como resultado, los fragmentos de anticuerpos resultantes son presentados en la superficie del bacteriófago, normalmente como fusiones a proteínas de recubrimiento del bacteriófago (p. ej., pIII o pVIII). Alternativamente, se presentan fragmentos de anticuerpos externamente en las cápsides de fago lambda (cuerpos de fagos). Una ventaja de los sistemas de presentación basados en fagos es que debido a que son sistemas biológicos, se pueden amplificar miembros de la biblioteca seleccionados simplemente haciendo crecer el fago que contiene el miembro de biblioteca seleccionado en células bacterianas. Además, puesto que la secuencia de nucleótidos que codifica el miembro de la biblioteca de polipéptidos está contenida en un vector de fago o fagémido, la secuenciación, expresión y posterior manipulación genética son relativamente directas.

Los procedimientos para la construcción de bibliotecas de presentación de anticuerpos en bacteriófagos y bibliotecas de expresión en fagos lambda son conocidas en la materia

(McCafferty y col. (1990) *Nature*, 348: 552; Kang y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 4363; Clackson y col. (1991) *Nature*, 352: 624; Lowman y col. (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Burton y col. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 10134; Hoogenboom y col. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133; Chang y col. (1991) *J. Immunol.*, 147: 3610; Breitling y col. (1991) *Gene*, 104: 147; Marks y col. (1991) véase antes; Barbas y col. (1992) véase antes; Hawkins y Winter (1992) *J. Immunol.*, 22: 867; Marks y col., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 16007; Lerner y col. (1992) *Science*, 258: 1313, incorporados en el presente documento por referencia).

Un procedimiento particularmente ventajoso ha sido el uso de bibliotecas de scFv en fagos (Huston y col., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883; Chaudhary y col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070; McCafferty y col. (1990) véase antes; Clackson y col. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Chiswell y col. (1992) *Trends Biotech.*, 10: 80; Marks y col. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267). Se han descrito diferentes realizaciones de bibliotecas de scFv presentadas en proteínas de recubrimiento de bacteriófagos. También se conocen modificaciones de los procedimientos de presentación en fagos, por ejemplo como se describe en los documentos WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council y col.) y WO97/08320 (Morphosys), que se incorporan en el presente documento por referencia.

Otros sistemas para generar bibliotecas de polipéptidos implican el uso de maquinaria enzimática sin células para la síntesis in vitro de miembros de la biblioteca. En un procedimiento, se seleccionan moléculas de ARN por ciclos alternados de selección frente a un ligando objetivo y amplificación por PCR (Tuerk y Gold (1990) *Science*, 249: 505; Ellington y Szostak (1990) *Nature*, 346: 818). Se puede usar una técnica similar para identificar secuencias de ADN que se unen a un factor de transcripción humano predeterminado (Thiesen y Bach (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18: 3203; Beaudry y Joyce (1992) *Science*, 257: 635; documentos WO92/052 y WO92/14843). De una forma similar, se puede usar la traducción in vitro para sintetizar polipéptidos como un procedimiento para generar bibliotecas grandes. Estos procedimientos que generalmente comprenden complejos de polisoma estabilizados, se describen además en los documentos WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058 y WO92/02536. Sistemas de presentación alternativos que no se basan en fagos, tales como los descritos en los documentos WO95/22625 y WO95/11922 (Affymax) usan los polisomas para presentar polipéptidos para la selección.

Otra categoría más de técnicas implica la selección de repertorios en compartimentos artificiales, que permiten la unión de un gen con su producto génico. Por ejemplo, se describe un sistema de selección en el que se pueden seleccionar ácidos nucleicos que codifican

productos génicos deseables en microcápsulas formadas por emulsiones de agua en aceite, en los documentos WO99/02671, WO00/40712 y Tawfik y Griffiths (1998) *Nature Biotechnol.* 16(7), 652-6. Se ponen en compartimentos elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad deseada en microcápsulas y después se transcriben y/o traducen para producir sus productos génicos respectivos (ARN o proteína) dentro de las microcápsulas. Los elementos genéticos que producen el producto génico que tiene la actividad deseada después se clasifican. Este procedimiento selecciona productos génicos de interés por detección de la actividad deseada mediante una variedad de medios.

B. Construcción de bibliotecas

Las bibliotecas destinadas a la selección, se pueden construir usando técnicas conocidas en la materia, por ejemplo como se ha expuesto antes, o se pueden adquirir de fuentes comerciales. Las bibliotecas que son útiles en la presente invención se describen, por ejemplo, en el documento WO99/20749. Una vez que se ha elegido un sistema vector y se clonan una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de interés en el vector de la biblioteca, se puede generar diversidad en las moléculas clonadas llevando a cabo la mutagénesis antes de la expresión; alternativamente, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse, como se ha descrito anteriormente, antes de la mutagénesis y se llevan a cabo ciclos adicionales de selección. La mutagénesis de secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos estructuralmente optimizados, se lleva a cabo mediante procedimientos moleculares estándar. Es particularmente útil la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, (Mullis y Faloona (1987) *Methods Enzymol.*, 155: 335, incorporado en el presente documento por referencia). La PCR que usa múltiples ciclos de replicación del ADN catalizados por una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable para amplificar una secuencia objetivo de interés, es bien conocida en la materia. La construcción de diferentes bibliotecas de anticuerpos se ha discutido en Winter y col. (1994) *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55, y referencias citadas en el mismo.

La PCR se realiza usando ADN molde (al menos 1 fg; más normalmente, 1-1000 ng) y al menos 25 pmol de cebadores oligonucleótidos; puede ser ventajoso usar una cantidad mayor de cebador cuando la mezcla de cebadores es muy heterogénea, ya que cada secuencia está representada solo por una pequeña fracción de moléculas de la mezcla, y las cantidades se convierten en limitantes en los últimos ciclos de amplificación. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 µl de ADN, 25 pmol de cebador oligonucleótido, 2,5 µl de 10X tampón 1 de la PCR (Perkin- Elmer, Foster City, CA), 0,4 µl de dNTP 1,25 µM, 0,15 µl (o 2,5 unidades) de ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada hasta un volumen total de 25 µl. Se recubre con aceite mineral y la PCR se lleva a cabo usando un ciclador

térmico programable. La longitud y temperatura de cada etapa de un ciclo de la PCR, así como el número de ciclos, se ajustan según los requisitos restrictivos vigentes. La temperatura y tiempo de reasociación están determinados ambos por la eficacia con la que se espera que un cebador se reasocie con un molde y el grado de apareamiento erróneo que se tolere; obviamente, cuando las moléculas de ácido nucleico se amplifican y se hace la mutagénesis simultáneamente, se requiere el apareamiento erróneo, al menos en el primer ciclo de síntesis. La capacidad para optimizar las restricciones de las condiciones de reasociación del cebador es conocida para el moderadamente experto en la materia. Se usa una temperatura de reasociación entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas de molde normalmente se produce entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguido de 20-40 ciclos que consisten en desnaturalización (94-99°C durante 15 segundos a 1 minuto), reasociación (temperatura determinada como se ha discutido antes; 1-2 minutos), y extensión (72°C durante 1-5 minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado). La extensión final en general es 4 minutos a 72°C, y le puede seguir una etapa indefinida (0-24 horas) a 4°C.

C. Combinación de dominios únicos complementarios

Los dominios, una vez seleccionados, se pueden combinar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo procedimientos covalentes y no covalentes.

Los procedimientos preferidos incluyen el uso de conectores polipeptídicos, como se describe, por ejemplo, en relación con moléculas scFv (Bird y col., (1988) *Science* 242: 423-426). Los conectores preferiblemente son flexibles, dejando que los dos dominios únicos interactúen. También se pueden usar los conectores usados en fragmentos bivalentes, que son menos flexibles (Holliger y col., (1993) *PNAS* (USA) 90:6444-6448).

Los dominios variables complementarios se pueden combinar usando procedimientos distintos de los conectores. Por ejemplo, se puede explotar el uso de puentes disulfuro, proporcionados por restos de cisteína naturales o formados por ingeniería, para estabilizar dímeros V_H-V_L (Reiter y col., (1994) *Protein Eng.* 7:697-704) o mediante el remodelado de la interfase entre los dominios variables para mejorar el "ajuste" y así la estabilidad de la interacción (Ridgeway y col., (1996) *Protein Eng.* 7:617-621; Zhu y col., (1997) *Protein Science* 6: 781-788).

Se pueden usar otras técnicas para unir o estabilizar dominios variables de inmunoglobulinas, y en particular dominios V_H y V_L de anticuerpos, según sean adecuadas.

Se contempla que los ligandos de doble especificidad pueden existir en conformaciones "abierta" o "cerrada" en disolución. Una conformación "abierta" es una confirmación en la que cada uno de los dominios de inmunoglobulina está presente en una

forma no asociada con otros dominios; en otras palabras, cada dominio está presente como un dominio único en disolución (aunque combinado, p. ej., con un conector, con el otro dominio). La configuración “cerrada” es aquella en la que los dos dominios (por ejemplo V_H y V_L) están presentes en forma asociada, tal como la de una pareja V_H - V_L asociada que forma un sitio de unión del anticuerpo. Por ejemplo, scFv puede estar en una conformación abierta o cerrada, dependiendo de la disposición del conector usado para unir los dominios V_H y V_L . Si este es suficientemente flexible para permitir que los dominios se asocien, o mantenerlos de forma rígida en la posición asociada, es probable que los dominios adopten una conformación cerrada. Sin embargo, se puede usar un conector corto o rígido para mantener los dominios V_H y V_L aparte, y prevenir que se forme una conformación cerrada.

Los fragmentos Fab y los anticuerpos enteros existirán principalmente en la conformación cerrada, aunque se apreciará que es probable que existan ligandos de doble especificidad abiertos y cerrados en una variedad de equilibrios en diferentes circunstancias. La unión del ligando a un objetivo es probable que desplace el equilibrio hacia la configuración abierta. Por lo tanto, los ligandos pueden existir en dos conformaciones en disolución, una de las cuales (la forma abierta) puede unir dos antígenos o epítomos independientemente, mientras que la conformación alternativa (la forma cerrada) solo puede unir un antígeno o epítomo; así los antígenos y epítomos compiten por la unión al ligando en esta conformación.

Aunque la forma abierta del ligando de doble especificidad puede así existir en equilibrio con la forma cerrada en disolución, se contempla que el equilibrio favorecerá la forma cerrada; además, la forma abierta puede ser secuestrada por la unión del objetivo en una conformación cerrada.

El ligando de doble especificidad puede estar presente en un equilibrio entre dos conformaciones (abierta y cerrada).

Los ligandos de doble especificidad se pueden modificar con el fin de favorecer una conformación abierta o cerrada. Por ejemplo, la estabilización de las interacciones de V_H - V_L con enlaces disulfuro estabiliza la conformación cerrada. Además, los conectores usados para unir los dominios se pueden construir de forma que se favorezca la forma abierta; por ejemplo, los conectores pueden impedir estéricamente la asociación de los dominios, tal como por la incorporación de restos aminoácidos grandes en sitios oportunos, o el diseño de una estructura rígida adecuada mantendrá los dominios físicamente espaciados entre sí.

D. Caracterización del ligando de doble especificidad

La unión del ligando de doble especificidad a sus antígenos o epítomos específicos se puede analizar por procedimientos que serán familiares para los expertos en la materia e incluyen el ELISA. En una realización preferida de la invención se analiza la unión usando

ELISA de fagos monoclonales.

El ELISA de fagos se pueden realizar según cualquier procedimiento adecuado; se expone un protocolo de ejemplo a continuación.

Las poblaciones de fagos producidas en cada ciclo de selección se pueden cribar por ELISA por la unión al antígeno o epítipo seleccionado, para identificar anticuerpos “policlonales” en fagos. Los fagos de colonias bacterianas infectadas únicas de estas poblaciones después se pueden cribar por ELISA para identificar los anticuerpos “monoclonales” en fagos. También es conveniente cribar los fragmentos de anticuerpos solubles por la unión al antígeno o epítipo, y esto también se puede llevar a cabo por ELISA usando reactivos, por ejemplo, contra un marcador C o N-terminal (véase, por ejemplo, Winter y col. (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55, y referencias citadas en el mismo)

La diversidad de los anticuerpos monoclonales en fagos seleccionados también se puede evaluar por electroforesis en gel de los productos de la PCR (Marks y col. 1991, véase antes; Nissim y col. 1994 véase antes), sondas (Tomlinson y col., 1992, *J. Mol. Biol.* 227, 776) o por secuenciación del vector de ADN.

E. Estructura de los “ligandos de doble especificidad”

Como se ha descrito antes, un anticuerpo se define en el presente documento como un anticuerpo (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgA, IgE) o fragmento (Fab, Fv, Fv unido por disulfuro, scFv, fragmento bivalente) que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera que son complementarios entre sí y por lo tanto se pueden asociar entre sí para formar una pareja V_H/V_L . Se pueden obtener de cualquier especie que produce un anticuerpo de forma natural, o se puede crear por tecnología de ADN recombinante; sea aislado de suero, células B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias.

En una realización, el ligando de doble especificidad comprende al menos un dominio variable de cadena pesada único de un anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera único de un anticuerpo, de modo que las dos regiones son capaces de asociarse para formar una pareja complementaria V_H/V_L .

El primero y el segundo dominios variables de dicho ligando pueden estar en la misma cadena de polipéptido. Alternativamente, pueden estar en cadenas de polipéptido separadas. En el caso de que estén en la misma cadena de polipéptido, pueden estar unidos por un conector flexible, que preferiblemente es una secuencia peptídica, como se ha descrito antes.

El primero y segundo dominios variables puede estar asociados de forma covalente o no covalente. En el caso estar asociados de forma covalente, los enlaces covalentes pueden ser enlaces disulfuro.

En el caso de que los dominios variables se seleccionen de repertorios de genes de V

seleccionados, por ejemplo, usando tecnología de presentación en fagos como se describe en el presente documento, entonces estos dominios variables comprenden un marco conservado universal, de modo que después puede ser reconocida por un ligando genérico específico como se define en el presente documento. El uso de marcos conservados universales, ligandos genéricos y similares, se describe en el documento VHO99/20749.

Cuando se usan repertorios de genes de V, la variación en la secuencia de polipéptido preferiblemente se localiza en los bucles estructurales de los dominios variables. Las secuencias de polipéptidos de cualquier dominio variable se pueden alterar por barajado de ADN o por mutación con el fin de potenciar la interacción de cada dominio variable con su pareja complementaria.

En una realización preferida de la invención, el "ligando de doble especificidad" es un fragmento Fv de cadena sencilla. En una realización alternativa de la invención, el "ligando de doble especificidad" consiste en una región Fab de un anticuerpo.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica al menos un "ligando de doble especificidad" como se describe en el presente documento,

Un experto en la materia apreciará que ambos antígenos o epítomos se pueden unir simultáneamente a la misma molécula de anticuerpo. Alternativamente, pueden competir por la unión a la misma molécula de anticuerpo. Por ejemplo, cuando ambos epítomos se unen simultáneamente, los dominios tanto V_H como V_L de un ligando de doble especificidad pueden unir independientemente sus epítomos objetivo. Cuando los dominios compiten, el V_H es capaz de unir su objetivo, pero no al mismo tiempo que el V_L une su objetivo cognado; o el V_L es capaz de unir su objetivo, pero no al mismo tiempo que el V_H une su objetivo cognado.

Las regiones variables pueden obtenerse de anticuerpos dirigidos contra antígenos o epítomos objetivo. Alternativamente, se pueden obtener de un repertorio de dominios únicos de anticuerpo tales como los expresados en la superficie de un bacteriófago filamentoso. La selección se puede realizar como se describe a continuación.

En general, las moléculas de ácido nucleico y construcciones de vectores necesarios para la realización de la presente invención, se pueden construir y manipular como se expone en los manuales de laboratorio estándar, tales como Sambrook y col. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, USA.

La manipulación de los ácidos nucleicos en la presente invención se lleva a cabo normalmente en vectores recombinantes.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico que codifica al menos un "ligando de doble especificidad" como

se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, vector se refiere a un elemento discreto que se usa para introducir ADN heterólogo en las células para la expresión y/o replicación del mismo. Los procedimientos mediante los cuales seleccionar o construir, y posteriormente usar dichos vectores son bien conocidos para la persona moderadamente experta en la materia. Hay numerosos vectores disponibles al público, incluyendo plásmidos bacterianos, bacteriófagos, cromosomas artificiales y vectores episómicos. Dichos vectores se pueden usar para la clonación sencilla y mutagénesis; alternatively se usa un vector de expresión de genes. Un vector para usar según la invención se puede seleccionar para acomodar una secuencia que codifica un polipéptido, de un tamaño deseado, normalmente de 0,25 kilobases (kb) a 40 kb o más de longitud. Una célula huésped adecuada se transforma con el vector después de las manipulaciones de clonación in vitro. Cada vector contiene diferentes componentes funcionales, que en general incluyen un sitio de clonación (o "policonector"), un origen de replicación y al menos un gen marcador seleccionable. Si el vector dado es un vector de expresión, además tiene uno o más de lo siguiente: elemento potenciador, promotor, terminación de la transcripción y secuencias señal, cada uno situado en la proximidad del sitio de clonación, de modo que están operativamente unidos al gen que codifica un miembro del repertorio de polipéptidos según la invención.

Tanto los vectores de clonación como de expresión en general contienen secuencias de ácido nucleico que permiten que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Normalmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican de forma autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido de 2 micrómetros es adecuado para levaduras, y diferentes orígenes víricos (p. ej., SV40, adenovirus) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos salvo que estos se usen en células de mamíferos capaces de replicar niveles altos de ADN, tales como las células COS.

Ventajosamente, un vector de clonación o expresión puede contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células huésped transformadas hechas crecer en un medio de cultivo selectivo. Por lo tanto, las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de

selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias auxotróficas, o proporcionan nutrientes críticos no disponibles en el medio de crecimiento.

Puesto que la replicación de vectores según la presente invención se lleva a cabo de forma más conveniente en *E. coli*, se puede usar un marcador seleccionable de *E. coli*, por ejemplo, el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Estos se pueden obtener de los plásmidos de *E. coli*, tales como pBR322 o un plásmido pUC tal como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente unido a la secuencia codificante de interés. Dicho promotor puede ser inducible o constitutivo. La expresión "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su forma pretendida. Una secuencia de control "operativamente unida" a una secuencia codificante está ligada de forma que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Los promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor del triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Los promotores para usar en sistemas bacterianos en general también contendrán una secuencia de Shine-Delgarno operativamente unida a la secuencia codificante.

Los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos que corresponde a un miembro de la biblioteca de polipéptidos. Por lo tanto, la selección con el primer y/o segundo antígeno o epítipo se puede realizar por propagación y expresión por separado de un solo clon que expresa el miembro de la biblioteca de polipéptidos o usando cualquier sistema de selección de presentación. Como se ha descrito antes, el sistema de selección de presentación preferido es la presentación en bacteriófagos. Por lo tanto, se pueden usar vectores de fago o fagémido. Los vectores preferidos son vectores de fagémidos que tienen un origen de replicación de *E. coli* (para la replicación de doble cadena) y también un origen de replicación de fago (para producir ADN monocatenario). La manipulación y expresión de dichos vectores es bien conocida en la materia (Hoogenboom y Winter (1992) véase antes; Nissim y col. (1994) véase antes). En resumen, el vector contiene un gen de β -lactamasa para conferir selectividad en el fagémido y un promotor *lac* secuencia arriba del casete de expresión que consiste en (N o C terminal) una secuencia líder *pelB* (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplásmico), un sitio de clonación múltiple (para la clonación de la versión de nucleótido del miembro de la biblioteca), opcionalmente, uno o más

marcadores peptídicos (para la detección), opcionalmente uno o más codones de parada TAG y la proteína pIII del fago. Por lo tanto, usando diferentes cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, isopropil- β -tiogalactósido (IPTG) o un fago auxiliar, tal como VCS M13, el vector es capaz de replicarse como un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades del miembro polipeptídico de la biblioteca solo o producir fagos, algunos de los cuales contienen al menos una copia de la fusión polipéptido-pIII en su superficie.

La construcción de vectores según la invención usa técnicas de ligado convencionales. Se escinden, diseñan y se vuelven a ligar vectores o fragmentos de ADN aislados en la forma deseada para generar el vector requerido. Si se desea, se puede llevar a cabo de una forma conocida el análisis para confirmar que está presente la secuencia correcta en el vector construido. Los procedimientos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcritos in vitro, introducir ADN en células huésped y realizar análisis para evaluar la expresión y función, son conocidos para el experto en la materia. La presencia de una secuencia de gen en una muestra se detecta, o se cuantifica su amplificación y/o expresión por procedimientos convencionales tales como análisis Southern o Northern, transferencia Western, transferencia en mancha de ADN, ARN o proteína, hibridación in situ, inmunoquímica o análisis de secuencias de ácidos nucleicos o moléculas de proteína. Los expertos en la materia contemplarán fácilmente cómo pueden modificarse estos procedimientos, si se desea.

F. Marcos conservados para usar en la construcción de ligandos de doble especificidad

i. Selección de la conformación de la cadena principal

Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas comparten todos un plegado similar para la cadena de polipéptido. Por ejemplo, aunque los anticuerpos son muy diversos en términos de su secuencia primaria, la comparación de secuencias y las estructuras cristalográficas han puesto de manifiesto, contrariamente a lo que se esperaba, que 5 de los 6 bucles de unión al antígeno de los anticuerpos (H1, H2, L1, L2, L3) adoptan un número limitado de conformaciones de la cadena principal, o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901; Chothia y col. (1989) *Nature*, 342: 877).

Por lo tanto, el análisis de las longitudes de los bucles y los restos clave ha permitido predecir las conformaciones de las cadenas principales H1, H2, L1, L2 y L3 encontradas en la mayoría de los anticuerpos humanos (Chothia y col. (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinson y col. (1995) *EMBO J.*, 14: 4628; Williams y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en términos de secuencia, longitud y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de la cadena principal para longitudes de bucle cortas que dependen de la longitud y la presencia de restos particulares, o tipos de restos, en posiciones clave en el bucle y el marco conservado del

anticuerpo (Martin y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai y col. (1996) *FEBS Letters*, 399: 1).

Los ligandos de doble especificidad de la presente invención se montan ventajosamente a partir de bibliotecas de dominios, tales como bibliotecas de dominios V_H y bibliotecas de dominios V_L . Además, los ligandos de doble especificidad de la invención, pueden proporcionarse ellos mismos en forma de bibliotecas. En un aspecto de la presente invención, se diseñan bibliotecas de ligandos de doble especificidad y/o dominios en los que se han elegido algunas longitudes de bucle y restos clave para asegurar que la conformación de la cadena principal de los miembros sea conocida. Ventajosamente, estas son conformaciones reales de moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas encontradas en la naturaleza, para minimizar las posibilidades de que no sean funcionales, como se ha discutido antes. Los segmentos de gen de V de la línea germinal sirven como un marco conservado básica adecuada para construir bibliotecas de anticuerpos o receptores de células T; y también son útiles otras secuencias. Se pueden producir variaciones con frecuencia baja, tal como que un número pequeño de miembros funcionales pueden tener una conformación de la cadena principal alterada, que no afecta a su función.

La teoría de la estructura canónica también es útil para evaluar el número de conformaciones de la cadena principal diferentes codificadas por ligandos, para predecir la conformación de la cadena principal basada en secuencias de ligandos y para elegir restos para la diversificación que no afectan a la estructura canónica. Se sabe que en el dominio V_K humano, el bucle L1 puede adoptar una de 4 estructuras canónicas, el bucle L2 tiene una sola estructura canónica y que el 90% de los dominios V_K humanos adoptan una de 4 ó 5 estructuras canónicas para el bucle L3 (Tomlinson y col. (1995) véase antes); por lo tanto, solo en el dominio V_K pueden combinarse diferentes estructuras canónicas para crear una variedad de conformaciones de la cadena principal diferentes. Dado que el dominio V_L codifica una variedad de estructuras canónicas diferentes para los bucles L1, L2 y L3, y que los dominios V_K y V_L pueden emparejarse con cualquier dominio V_H que pueda codificar varias estructuras canónicas para los bucles H1 y H2, el número de combinaciones de estructuras canónicas observado para estos 5 bucles es muy grande. Esto implica que la generación de diversidad en la conformación de la cadena principal puede ser esencial para la producción de una amplia variedad de especificidades de unión. Sin embargo, al construir una biblioteca de anticuerpos basada en una sola conformación de la cadena principal conocida, se ha encontrado que, contrariamente a lo que se esperaba, no es necesaria esta diversidad en la conformación de la cadena principal para generar una diversidad suficiente para dirigir sustancialmente todos los antígenos. Incluso más sorprendentemente, la conformación única de la cadena principal no es

necesario que sea una estructura consenso, se puede usar una conformación única natural como base para una biblioteca entera. Por lo tanto, en un aspecto preferido, los ligandos de doble especificidad de la invención tienen una conformación de cadena principal única conocida.

5 La conformación de cadena principal única que se elige preferiblemente es común entre las moléculas de la familia de inmunoglobulinas del tipo en cuestión. Una conformación es común cuando se observa que la adopta un número significativo de moléculas naturales. Por consiguiente, en un aspecto preferido de la invención, se considera por separado la incidencia natural de las diferentes conformaciones de la cadena principal para cada bucle de
10 unión de un dominio de inmunoglobulina, y después se elige un dominio variable natural que tiene la combinación deseada de conformaciones de la cadena principal para los diferentes bucles. Si no está disponible ninguna, se puede elegir el equivalente más cercano. Es preferible que la combinación deseada de conformaciones de la cadena principal para diferentes bucles se cree seleccionando segmentos de genes de la línea germinal que
15 codifican las conformaciones deseadas de la cadena principal. Es más preferible que los segmentos de genes de línea germinal seleccionados sean expresados con frecuencia en la naturaleza, y más preferible que sean los expresados con mayor frecuencia de todos los segmentos de genes de línea germinal naturales.

 Al diseñar los ligandos de doble especificidad o las bibliotecas de los mismos, se puede
20 considerar por separado la incidencia de las diferentes conformaciones de la cadena principal para cada uno de los 6 bucles de unión al antígeno. Para H1, H2, L1, L2 y L3, se elige una conformación dada que es adoptada por entre 20% y 100% de los bucles de unión al antígeno de las moléculas naturales. Normalmente, su incidencia observada es superior a 35% (es decir, entre 35% y 100%) e idealmente superior a 50% o incluso superior a 65%. Puesto que la
25 inmensa mayoría de los bucles H3 no tienen estructuras canónicas, es preferible seleccionar una conformación de la cadena principal que sea común entre aquellos bucles que no presentan estructuras canónicas. Por lo tanto, para cada uno de los bucles, se selecciona la conformación que se observa con más frecuencia en el repertorio natural. En los anticuerpos humanos, las estructuras canónicas (CS) más populares para cada bucle son las siguientes:
30 H1 - CS 1 (79% del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46%), L1 - CS 2 de V κ (39%), L2 - CS 1 (100%), L3 - CS1 de V κ (36%) (el cálculo supone una relación $\kappa:\lambda$ de 70:30, Hood y col. (1967) Cold Spring Harbor *Symp. Quant Biol.*, 48: 133). Para los bucles H3 que tienen estructuras canónicas, parece que la más común es CDR3 (Kabat y col. (1991) "Sequences of proteins of immunological interest", U.S. Department of Health and Human Services) de 7 restos de
35 longitud con un puente salino desde el resto 94 al resto 101. Hay al menos 16 secuencias de

anticuerpos humanos en la biblioteca de datos de EMBL con la longitud de H3 y restos clave requeridos para formar esta conformación y al menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteínas que se pueden usar como una base para el modelado del anticuerpo (2cgr y 1tet). Los segmentos de genes de la línea germinal expresados con más frecuencia en esta combinación de estructuras canónicas son el segmento V_H 3-23 (DP-47), el segmento J_H JH4b, el segmento V_K O2/012 (DPK9) y el segmento J_K , J_K1 . Los segmentos V_H DP45 y DP38 también son adecuados. Por lo tanto, estos segmentos se pueden usar en combinación como una base para construir una biblioteca con la conformación deseada de cadena principal única.

Alternativamente, en lugar de elegir la conformación de cadena principal única basada en la incidencia natural de las diferentes conformaciones de la cadena principal para cada uno de los bucles de unión aislados, se usa la incidencia natural de las combinaciones de conformaciones de la cadena principal como base para elegir la conformación de cadena principal única. En el caso de anticuerpos, por ejemplo, se puede determinar la incidencia natural de combinaciones de estructuras canónicas para cualquiera de los 2, 3, 4, 5 o para los 6 bucles de unión al antígeno. Aquí, es preferible que la conformación elegida sea común en los anticuerpos naturales y lo más preferible que se observe con la mayor frecuencia en el repertorio natural. Por lo tanto, en los anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando se consideran las combinaciones naturales de los 5 bucles de unión al antígeno, H1, H2, L1, L2 y L3, se determina la combinación más frecuente de estructuras canónicas y después se combinan con la conformación más popular para el bucle H3, como base para elegir la conformación de cadena principal única.

ii. Diversificación de la secuencia canónica

Habiendo seleccionado varias conformaciones de la cadena principal conocidas o, preferiblemente, una conformación de cadena principal única conocida, se pueden construir ligandos de doble especificidad según la invención o bibliotecas para usar en la invención, variando el sitio de unión de la molécula con el fin de generar un repertorio con diversidad estructural y/o funcional. Esto significa que se generan variantes tales que tienen suficiente diversidad en su estructura y/o en su función de modo que son capaces de proporcionar una variedad de actividades.

La diversidad deseada normalmente se genera variando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones que se van a cambiar se pueden elegir aleatoriamente o preferiblemente se seleccionan. Por lo tanto, la variación se puede lograr por distribución aleatoria, durante la cual el aminoácido residente se sustituye por cualquier aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, produciendo un número muy grande de variantes, o

sustituyendo el aminoácido residente por uno o más de un subconjunto definido de aminoácidos, produciendo un número de variantes más limitado.

Se han descrito varios procedimientos para introducir dicha diversidad. Se puede usar la PCR propensa a error (Hawkins y col. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226: 889), mutagénesis química (Deng y col. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269: 9533) o cepas mutadoras bacterianas (Low y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 260: 359) para introducir mutaciones aleatorias en los genes que codifican la molécula. Los procedimientos para mutar posiciones seleccionadas también son bien conocidas en la materia e incluyen el uso de oligonucleótidos con apareamientos erróneos u oligonucleótidos degenerados, con o sin usar la PCR. Por ejemplo, se han creado varias bibliotecas de anticuerpos sintéticos dirigiendo mutaciones a los bucles de unión al antígeno. La región H3 de un Fab que se une al toxoide tetánico humano se ha aleatorizado para crear una variedad de especificidades de unión nuevas (Barbas y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457). Las regiones H3 y L3 aleatorias o semialeatorias se han agregado a segmentos de genes de V de la línea germinal para producir bibliotecas grandes con marcos conservados no mutadas (Hoogenboom y Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457; Nissim y col. (1994) *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths y col. (1994) *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruif y col. (1995) *J. Mol. Biol.*, 248: 97). Dicha diversificación se ha extendido para incluir algunos o todos de los otros bucles de unión al antígeno (Cramer y col. (1996) *Nature Med.*, 2: 100; Riechmann y col. (1995) *Bio/Technology*, 13: 475; Morphosys, documento WO97/08320, véase antes).

Puesto que la aleatorización de bucles tiene el potencial de crear aproximadamente más de 10^{15} estructuras para H3 solo y un número igualmente grande de variantes para los otros cinco bucles, no es factible usar la actual tecnología de transformación o incluso usar sistemas sin células para producir una biblioteca que represente todas las posibles combinaciones. Por ejemplo, en una de las bibliotecas más grandes construidas hasta la fecha, se generaron 6×10^{10} anticuerpos diferentes, que es solo una fracción de la diversidad potencial para una biblioteca de este diseño (Griffiths y col. (1994), véase antes).

Preferiblemente, solo se diversifican aquellos residuos que están directamente implicados en la creación o modificación de la función deseada de la molécula. Para muchas moléculas, la función será unir un objetivo y por lo tanto la diversidad se puede concentrar en el sitio de unión objetivo, mientras que se evita el cambio de restos que son importantes para el empaquetamiento global de la molécula o para mantener la conformación de cadena principal elegida.

Diversificación de la secuencia canónica cuando se aplica a dominios de anticuerpo

En el caso de ligandos de doble especificidad de anticuerpos, el sitio de unión para el

objetivo es, con mayor frecuencia, el sitio de unión al antígeno. Por lo tanto, en un aspecto muy preferido, la invención proporciona bibliotecas de o para el montaje de ligandos de doble especificidad de anticuerpos, en los que solo se varían los restos en el sitio de unión al antígeno. Estos restos son extremadamente diversos en el repertorio de anticuerpos humanos, y se sabe que hacen contactos en complejos de anticuerpo/antígeno de alta resolución. Por ejemplo, se sabe que en L2 las posiciones 50 y 53 son diversas en los anticuerpos naturales y se observa que hacen contacto con el antígeno. A diferencia de esto, el procedimiento convencional habría sido diversificar todos los restos en la correspondiente región determinante de la complementariedad (CDR1) como definen Kabat y col. (1991, véase antes), algunos grupos de siete restos, comprado con los dos diversificados en la biblioteca para usar en la invención. Esto representa una mejora significativa en términos de la diversidad funcional necesaria para crear una variedad de especificidades de unión al antígeno.

En la naturaleza, la diversidad de anticuerpos es el resultado de dos procesos: la recombinación somática de los segmentos de genes de V, D y J de la línea germinal para crear un repertorio principal virgen (llamado línea germinal y diversidad de unión) y la hipermutación somática de los genes de V reorganizados resultantes. El análisis de las secuencias de anticuerpos humanos ha mostrado que la diversidad en el repertorio principal está enfocada en el centro del sitio de unión al antígeno, mientras que la hipermutación somática extiende la diversidad a regiones en la periferia del sitio de unión al antígeno que son muy conservadas en el repertorio principal (véase Tomlinson y col. (1996) *J. Mol. Biol.*, 256: 813). Esta complementariedad probablemente ha evolucionado como una estrategia eficaz para buscar espacio de secuencias, y aunque aparentemente es único de anticuerpos, se puede aplicar fácilmente a otros repertorios de polipéptidos. Estos restos que varían son un subconjunto de los que forman el sitio de unión para el objetivo. Diferentes subconjuntos (incluyendo la superposición) de restos en el sitio de unión objetivo se diversifican en diferentes etapas durante la selección, si se desea.

En el caso de un repertorio de anticuerpos, se crea un repertorio inicial "virgen" en el que algunos, pero no todos los restos en el sitio de unión al antígeno están diversificados. Como se usa en el presente documento en este contexto, el término "virgen" se refiere a moléculas de anticuerpo que no tienen objetivo predeterminado. Estas moléculas se parecen a las que son codificadas por los genes de inmunoglobulina de un individuo que no ha experimentado diversificación inmunitaria, como es el caso en los individuos fetales y recién nacidos, cuyos sistemas inmunitarios no han sido estimulados por una amplia variedad de estímulos antigénicos. Después, este repertorio se selecciona contra una variedad de antígenos o epítomos. Si es necesario, entonces se puede introducir más diversidad fuera de la

región diversificada en el repertorio inicial. Este repertorio madurado se puede seleccionar para la función, especificidad o afinidad modificadas.

Se pueden proporcionar dos repertorios vírgenes diferentes de dominios de unión para construir los ligandos de doble especificidad, o una biblioteca virgen de ligandos de doble especificidad, en los que algunos o todos los restos en el sitio de unión al antígeno se han variado. La biblioteca "principal" imita el repertorio principal natural, con la diversidad restringida a los restos en el centro del sitio de unión al antígeno que son diversos en los segmentos de genes de V de la línea germinal (diversidad de la línea germinal) o se diversifican durante el procedimiento de recombinación (diversidad de unión). Los restos que se diversifican incluyen, pero sin limitar, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96.

En la biblioteca "somática", la diversidad está restringida a los restos que se diversifican durante el proceso de recombinación (diversidad de unión), o tienen una alta mutación somática. Aquellos restos que se diversifican incluyen, pero sin limitar H31, H33, H35, H95, H96, H97, H98, L30, L31, L32, L34 y L96. Todos los restos listados antes son adecuados para la diversificación en estas bibliotecas, y se sabe que hacen contactos en uno o más de los complejos de anticuerpo-antígeno. Puesto que en ambas bibliotecas no todos los restos en el sitio de unión al antígeno han variado, se incorpora diversidad adicional durante la selección variando los restos que quedan, si se desea hacer esto. Será evidente para un experto en la materia que cualquier subconjunto de cualquiera de estos restos (o restos adicionales que comprenden el sitio de unión al antígeno) se puede usar para la diversificación inicial y/o posterior del sitio de unión al antígeno.

En la construcción de las bibliotecas para usar en la invención, la diversificación de las posiciones elegidas normalmente se logra a nivel de los ácidos nucleicos, alterando la secuencia codificante que especifica la secuencia del polipéptido, de modo que se puede incorporar una serie de posibles aminoácidos (los 20 o un subconjunto de los mismos) en esa posición. Usando la nomenclatura de ILTPAC, el codón más versátil es NNK, que codifica todos los aminoácidos así como el codón de parada TAG. El codón NNK se usa preferiblemente con el fin de introducir la diversidad requerida. También son útiles otros codones que consiguen los mismos fines, incluyendo el codón NNN, que conduce a la producción de los codones de parada adicionales TGA y TAA.

Una característica de la diversidad de la cadena lateral en el sitio de unión del antígeno de los anticuerpos humanos es una predisposición pronunciada que favorece algunos restos de aminoácidos. Si se suma la composición de aminoácidos de las 10 posiciones más diversas en cada una de las regiones V_H , V_K y V_L , más del 76% de la diversidad de la cadena lateral

viene de solo 7 restos diferentes, siendo estos, serina (24%), tirosina (14%), asparagina (11%), glicina (9%), alanina (7%), aspartato (6%) y treonina (6%). Esta predisposición por restos hidrófilos y restos pequeños que pueden proporcionar flexibilidad a la cadena lateral, probablemente refleja la evolución de las superficies que están predispuestas a unir una amplia variedad de antígenos o epítomos y pueden ayudar a explicar la promiscuidad necesaria de los anticuerpos en el repertorio primario,

Puesto que es preferible imitar esta distribución de aminoácidos, la distribución de aminoácidos en las posiciones que se van a variar imitan preferiblemente la observada en el sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Dicha predisposición en la sustitución de aminoácidos que permite la selección de determinados polipéptidos (no solo polipéptidos anticuerpos) contra una variedad de antígenos objetivo, se aplica fácilmente a cualquier repertorio de polipéptidos. Hay diferentes procedimientos para predisponer la distribución de aminoácidos en la posición que se va a variar (incluyendo el uso de la mutagénesis de trinucleótidos, véase el documento WO 97/08320), de los cuales el procedimiento preferido, debido a la facilidad de síntesis, es el uso de codones degenerados convencionales. Comparando el perfil de aminoácidos codificados por todas las combinaciones de codones degenerados (con degeneración sencilla, doble, triple y cuádruple en proporciones iguales en cada posición) con el uso de aminoácidos naturales, se puede calcular el codón más representativo. Los codones (AGT)(AGC)T, (AGT)(AGC)C y (AGT)(AGC) (CT), es decir, DVT, DVC y DVY, respectivamente usando la nomenclatura IUPAC, son los más cercanos al perfil de aminoácidos deseado: codifican 22% de serina y 11% de tirosina, asparagina, glicina, alanina, aspartato, treonina y cisteína. Por lo tanto, preferiblemente las bibliotecas se construyen usando el codón DVT, DVC o DVY en cada una de las posiciones diversificadas.

G: Uso de ligandos de doble especificidad según la invención

Los ligandos de doble especificidad seleccionados según el procedimiento de la presente invención, se pueden usar en aplicaciones terapéuticas y profilácticas in vitro, aplicaciones de diagnóstico in vitro e in vivo, aplicaciones de ensayos y reactivos in vitro, y similares. Por ejemplo, se pueden usar moléculas de anticuerpo en técnicas de ensayo basadas en anticuerpos, tales como técnicas ELISA, según procedimientos conocidos para los expertos en la materia.

Como se ha mencionado antes, las moléculas seleccionadas según la invención tienen utilidad en procedimientos de diagnóstico, profilácticos y terapéuticos. Los anticuerpos de doble especificidad seleccionados según la invención, son útiles para el diagnóstico en análisis Western y en detección de proteínas in situ por procedimientos inmunohistoquímicos estándar; para usar en estas aplicaciones, los anticuerpos de un repertorio seleccionado se pueden

marcar según técnicas conocidas en la materia. Además, dichos polipéptidos anticuerpos se pueden usar de forma preparativa en procedimientos de cromatografía por afinidad, cuando forman complejo con un soporte cromatográfico, tal como una resina. Todas dichas técnicas son bien conocidas para el experto en la materia.

5 Los usos para diagnóstico de los ligandos de doble especificidad según la invención, incluyen ensayos homogéneos para analitos que explotan la capacidad de los ligandos de doble especificidad para unir dos objetivos en competición, de modo que dos objetivos no pueden unirse simultáneamente (una conformación cerrada) o, alternativamente, su capacidad para unir dos objetivos simultáneamente (una conformación abierta).

10 Los fabricantes han buscado con avidez un formato de inmunoensayo homogéneo verdadero de sistemas de diagnóstico y de ensayos de investigación usados en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Los mercados de diagnóstico principales incluyen ensayos humanos en hospitales, consultorios y clínicas médicas, laboratorios de referencia comerciales, bancos de sangre, y los diagnósticos no humanos domésticos (por ejemplo, 15 análisis de alimentos, análisis de agua, análisis medioambientales, biodefensa y análisis veterinarios), y finalmente investigación (incluyendo el desarrollo de fármacos; investigación básica e investigación académica).

Actualmente, todos estos mercados usan sistemas de inmunoensayo que se basan en tecnologías de quimioluminiscencia, ELISA, fluorescencia o en casos raros 20 radioinmunoensayo. Cada uno de estos formatos de ensayo requiere una etapa de separación (separación de reactivos unidos de no unidos). En algunos casos, se requieren varias etapas de separación. La adición de estas etapas adicionales añade reactivos y automatización, requiere tiempo, y afecta al resultado final de los ensayos. En los diagnósticos humanos, la etapa de separación puede ser automática, lo cual enmascara el problema, pero no lo elimina. 25 La robótica, los reactivos adicionales, los tiempos de incubación adicionales, y similares, añaden un coste y complejidad considerables. En el desarrollo de fármacos, tal como el cribado de alto rendimiento, en el que se ensayan de una vez literalmente millones de muestras, con niveles muy bajos de moléculas de ensayo, la adición de etapas de separación adicionales puede eliminar la capacidad de realizar un cribado. Sin embargo, el evitar la 30 separación crea demasiado ruido en la lectura del resultado. Por lo tanto, existe la necesidad de un formato homogéneo verdadero que proporcione sensibilidades en el intervalo que se puede obtener a partir de los formatos de ensayo presentes. Ventajosamente, un ensayo tendrá lecturas completamente cuantitativas con alta sensibilidad y un intervalo dinámico grande. La sensibilidad es un requisito importante, así como lo es reducir la cantidad de 35 muestra requerida. Ambas características son características que ofrece un sistema

homogéneo. Esto es muy importante en el análisis de diagnóstico inmediato, y en el desarrollo de fármacos donde las muestras son valiosas. Los sistemas heterogéneos, disponibles actualmente en la técnica, requieren grandes cantidades de muestra y reactivos caros.

Las aplicaciones para los ensayos homogéneos incluyen el ensayo de cáncer, en el que el ensayo mayor es el del antígeno específico prostático, usado en el cribado de cáncer de próstata en hombres. Otras aplicaciones incluyen ensayos de fertilidad, que proporcionan una serie de ensayos para mujeres que intentan concebir, incluyendo el beta-hCG para embarazos. Ensayos para otras enfermedades infecciosas, incluyendo hepatitis, HIV, rubeola y otros virus y microorganismos y enfermedades de transmisión sexual. Los ensayos los usan los bancos de sangre, en especial los ensayos para el VIH, hepatitis A, B, C, no A no B. Los ensayos de seguimiento de fármacos terapéuticos incluyen el seguimiento de los niveles de fármacos prescritos en pacientes para la eficacia y evitar la toxicidad, por ejemplo la digoxina para la arritmia, y niveles de fenobarbital en casos psicóticos; teofilina para el asma. Los ensayos de diagnóstico son útiles además en análisis de abuso de fármacos, tales como análisis de cocaína, marihuana y similares. Los ensayos metabólicos se usan para medir la función tiroidea, anemia y otros trastornos y funciones fisiológicas.

El formato de inmunoensayo homogéneo es además útil en la fabricación de ensayos químicos clínicos estándar. La inclusión de inmunoensayos y ensayos químicos en el mismo instrumento es muy ventajosa en los análisis de diagnóstico. Los ensayos químicos adecuados incluyen análisis de glucosa, colesterol, potasio, y similares.

Otra aplicación principal para los inmunoensayos homogéneos es el descubrimiento y desarrollo de fármacos: los cribados de alto rendimiento incluyen el análisis de bibliotecas químicas combinatorias frente a objetivos en volúmenes ultragrandes. Se detecta la señal y después los grupos positivos se dividen en grupos más pequeños, y finalmente se analizan en células y después en animales. Se pueden usar ensayos homogéneos en todos estos tipos de análisis. En el desarrollo de fármacos, en especial en estudios animales y ensayos clínicos, se hace un uso intensivo de inmunoensayos. Los ensayos homogéneos aceleran y simplifican mucho estos procedimientos. Otras aplicaciones incluyen el análisis de alimentos y bebidas: análisis de *E. coli*, salmonela, etc. en la carne y otros alimentos, incluyendo el análisis en plantas acuáticas de todo tipo de contaminantes incluyendo *E. coli*; y análisis veterinarios.

En una amplia realización, la descripción proporciona un ensayo de unión que comprende un agente detectable que se une a una ligando de doble especificidad según la invención, y cuyas propiedades de detección son alteradas por la unión de un analito a dicho ligando de doble especificidad. Dicho ensayo se puede configurar en varias formas diferentes, que explota cada una las propiedades anteriores de los ligandos de doble especificidad.

Cuando el ligando de doble especificidad está en una conformación cerrada, el ensayo se basa en el desplazamiento directo o indirecto de un agente por el analito, que da como resultado un cambio en las propiedades detectables del agente. Por ejemplo, cuando el agente es una enzima, que es capaz de catalizar una reacción que tiene un punto final detectable, dicha enzima se puede unir al ligando y así obstruir su sitio activo, inactivando de esta forma la enzima. El analito, que también se une al ligando de doble especificidad desplaza la enzima, convirtiéndola en activa al liberar el sitio activo. La enzima después puede reaccionar con un sustrato, para dar lugar a un suceso detectable. En una realización alternativa, el ligando se puede unir a la enzima fuera del sitio activo, influyendo en la conformación de la enzima y por lo tanto alterando su actividad. Por ejemplo, la estructura del sitio activo puede estar limitada por la unión del ligando, o se puede prevenir la unión de cofactores necesarios para la actividad.

La implementación física del ensayo puede tener cualquier forma conocida en la técnica. Por ejemplo, el complejo de ligando de doble especificidad/enzima se puede proporcionar en una tira de análisis; el sustrato se puede proporcionar en una región diferente de la tira de análisis, y el disolvente que contiene el analito se deja migrar por el complejo de ligando/enzima, desplazando la enzima, y llevándola a la región del sustrato para producir una señal. Alternativamente, el complejo de ligando/enzima se puede proporcionar en un bastón de análisis u otra fase sólida, y sumergir en una disolución de analito/sustrato, liberando la enzima en la disolución en respuesta a la presencia del analito.

Puesto que cada molécula de analito libera potencialmente una molécula de enzima, el ensayo es cuantitativo, dependiendo la fuerza de la señal generada en un momento dado, de la concentración de analito en la disolución.

Son posibles otras configuraciones usando el analito en una conformación cerrada. Por ejemplo, el ligando de doble especificidad se puede configurar para unir una enzima en un sitio alostérico, activando así la enzima. En dicha realización, la enzima es activa en ausencia del analito. La adición del analito desplaza la enzima y elimina la activación alostérica, inactivando así la enzima.

En el contexto de las realizaciones anteriores que usan la actividad enzimática como una medida de la concentración de analito, la activación o inactivación de la enzima se refiere a un aumento o disminución de la actividad de la enzima, medida como la capacidad de la enzima para catalizar una reacción de generación de señal. Por ejemplo, la enzima puede catalizar la conversión de un sustrato no detectable en una forma del mismo detectable. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se usa ampliamente en la técnica junto con sustratos cromogénicos o quimioluminiscentes, que están disponibles en el comercio. El nivel de

aumento o disminución de la actividad de la enzima puede ser entre 10% y 100%, tal como 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%; en el caso de un aumento de actividad, el aumento puede ser más de 100%, es decir 200%, 300%, 500% o más, o puede no ser medible como un porcentaje, si el valor base de la actividad de la enzima inhibida no es detectable.

5 En una configuración adicional, el ligando de doble especificidad puede unir el sustrato de una pareja de enzima/sustrato, en lugar de la enzima. Entonces, el sustrato no está disponible para la enzima hasta que es liberado del ligando de doble especificidad por unión del analito. Las implementaciones para esta configuración son como para las configuraciones que unen enzimas.

10 Además, el ensayo se puede configurar para unir una molécula fluorescente, tal como una fluoresceína u otro fluoróforo, en una conformación de modo que la fluorescencia es atenuada al unirse al ligando. En este caso, la unión del analito al ligando desplazará la molécula fluorescente, produciendo así una señal. Las alternativas a moléculas fluorescentes que son útiles en la presente invención incluyen agentes luminiscentes, tales como
15 luciferina/luciferasa, y agentes cromógenos, incluyendo agentes usados normalmente en inmunoensayos, tal como HRP.

 El ensayo puede además configurarse usando un ligando de doble especificidad en la conformación “abierta”. En esta conformación, el ligando de doble especificidad es capaz de unir dos objetivos simultáneamente. Por ejemplo, en una primera realización, el ensayo se
20 puede configurar de modo que el ligando de doble especificidad une una enzima y un sustrato, en el que la enzima tiene una afinidad baja por el sustrato; y cualquiera de la enzima o el sustrato es el analito. Cuando tanto el sustrato como la enzima son llevados juntos por el ligando de doble especificidad, se potencia la interacción entre los dos, conduciendo a una señal potenciada.

25 Alternativamente, el ligando de doble especificidad puede unir una molécula fluorescente, como antes, que es atenuada por la unión del analito. Por lo tanto, en esta realización, la fluorescencia se puede detectar en ausencia del analito, pero se atenúa en presencia del mismo.

 La implementación básica de dicho ensayo es como se ha proporcionado antes para
30 los ensayos de conformación cerrada.

 Los usos terapéuticos y profilácticos de los ligandos de doble especificidad preparados según la invención, implican la administración de ligandos seleccionados según la invención, a un mamífero receptor, tal como un ser humano. La doble especificidad puede permitir que los anticuerpos se unan a antígenos multiméricos con gran avidez. Los anticuerpos de doble
35 especificidad pueden permitir el entrecruzamiento de dos antígenos, por ejemplo en el

reclutamiento de linfocitos T citotóxicos para mediar en la muerte de líneas celulares tumorales.

Se prefieren los anticuerpos sustancialmente puros o proteínas de unión a los mismos de al menos 90 a 95% de homogeneidad, para la administración a un mamífero, y se prefiere de 98 a 99% o más de homogeneidad para usos farmacéuticos, en especial cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los polipéptidos seleccionados se pueden usar en diagnóstico o en forma terapéutica (incluyendo extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) “Immunological Methods”, Volúmenes I y II, Academic Press, NY).

Los anticuerpos o proteínas de unión a los mismos seleccionados de la presente invención normalmente serán útiles para prevenir, suprimir o tratar estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunes (que incluyen, pero sin limitar, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia grave).

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 la administración de la composición después de un suceso inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. El “tratamiento” implica la administración de la composición protectora después de que los síntomas de la enfermedad se han puesto de manifiesto.

Se encuentran disponibles sistemas de modelos animales que se pueden usar para cribar la eficacia de los anticuerpos o proteínas de unión a los mismos en la protección contra o en el tratamiento de la enfermedad. Se conocen en la técnica procedimientos para analizar el lupus eritematoso sistémico (LES) en ratones susceptibles (Knight y col. (1978) *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten y col. (1978) *New Eng. J. Med.*, 299: 515). La miastenia grave (MG) se ensaya en ratones hembra SJL/J induciendo la enfermedad con la proteína AchR soluble de otras especies (Lindstrom y col. (1988) *Adv. Immunol.*, 42: 233). La artritis es inducida en una cepa de ratones susceptible por inyección de colágeno de tipo II (Stuart y col. (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Se ha descrito un modelo mediante el cual se induce la artritis adyuvante en ratas susceptibles por inyección de la proteína de choque térmico micobacteriana (Van Eden y col. (1988) *Nature*, 331: 171). La tiroiditis es inducida en ratones por administración de tiroglobulina como se ha descrito (Maron y col. (1980) *J. Exp. Med.*, 152: 1115). La diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) aparece de forma natural o se puede inducir en determinadas cepas de ratones tales como las descritos por Kanasawa y col. (1984) *Diabetologia*, 27: 113. La EAE en ratones y ratas sirve de modelo para la EM en seres

humanos. En este modelo, la enfermedad de desmielinización es inducida por administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) "Textbook of Immunopathology", Mischer y col., eds., Grune y Stratton, New York, págs. 179-213; McFarlin y col. (1973) *Science*, 179: 478; y Satoh y col. (1987) *J. Immunol.*, 138:179).

5 En general, los presentes anticuerpos seleccionados se usarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente adecuados. Normalmente, estos vehículos incluyen disoluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo cualquier medio salino y/o tamponado. Los vehículos parentales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y Ringer lactato. Los adyuvantes
10 fisiológicamente aceptables adecuados, si son necesarios para mantener un complejo de polipéptido en suspensión, se pueden elegir de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

 Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes y reabastecedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer. También
15 pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª Edición).

 Los polipéptidos seleccionados de la presente invención se pueden usar como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Estos pueden incluir
20 diferentes fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diferentes agentes citotóxicos u otros agentes junto con los anticuerpos, receptores o proteínas de unión a los mismos seleccionados de la presente invención, o incluso combinaciones de polipéptidos seleccionados según la presente invención que tienen diferentes especificidades,
25 tales como los polipéptidos seleccionados usando diferentes ligandos objetivo, se mezclen o no antes de la administración.

 La vía de administración de composiciones farmacéuticas según la invención, puede ser cualquiera de las conocidas normalmente por los expertos en la materia. Para terapia, incluyendo sin limitación inmunoterapia, los anticuerpos, receptores o proteínas de unión a los
30 mismos seleccionados de la invención, se pueden administrar a cualquier paciente según técnicas estándar. La administración puede ser cualquier por modo adecuado, incluyendo la vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, pulmonar, o también adecuadamente por infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerán de la edad, sexo y afección del paciente, administración simultánea
35 de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que tendrá que tener en cuenta el

médico.

Los polipéptidos seleccionados de esta invención se pueden liofilizar para almacenar y reconstituir en un vehículo adecuado antes de usar. Se ha mostrado que esta técnica es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y se pueden usar las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la materia. Los expertos en la materia apreciarán que la liofilización y reconstitución pueden conducir a diferentes grados de pérdida de actividad del anticuerpo (p. ej., con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienen a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y que los niveles de uso deben ajustarse hacia arriba para compensar.

Las composiciones que contienen los presentes polipéptidos seleccionados o un cóctel de los mismos, se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En algunas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para llevar a cabo, al menos parcialmente, la inhibición, supresión, modulación, muerte o algún otro parámetro medible, de una población de células seleccionadas, se define como una "dosis terapéuticamente eficaz".

Las cantidades necesarias para lograr esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad, y el estado general del sistema inmunitario del propio paciente, pero en general está en el intervalo de 0,005 a 5,0 mg del anticuerpo, receptor (p. ej., receptor de células T) o proteína de unión al mismo seleccionado por kilogramo de peso corporal, usándose de forma más habitual dosis de 0,05 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes polipéptidos seleccionados o cócteles de los mismos, también se pueden administrar de una forma similar o con dosificaciones ligeramente inferiores.

Se puede usar una composición que contiene un polipéptido seleccionado según la presente invención en marcos profilácticos y terapéuticos para ayudar a la alteración, inactivación, muerte o eliminación de una población de células objetivo seleccionada en un mamífero. Además, los repertorios de polipéptidos seleccionados descritos en el presente documento se pueden usar de forma extracorpórea o in vitro, para matar, reducir drásticamente o eliminar eficazmente de otra forma, de manera selectiva, una población de células objetivo de una colección heterogénea de células. Se puede combinar la sangre de un mamífero de forma extracorpórea con los anticuerpos, receptores de superficie celular o proteínas de unión a los mismos seleccionados, de modo que las células indeseadas mueran o sean eliminadas de otra forma de la sangre, para devolverla al mamífero según técnicas estándar.

La invención se describe además, sólo con propósitos de ilustrar, en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Selección de un anticuerpo scFv de doble especificidad (K8) dirigido contra albúmina de suero humano (HSA) y β -galactosidasa (β -gal)

Este ejemplo explica un procedimiento para hacer un anticuerpo de doble especificidad dirigido contra β -gal y HSA, en el que se selecciona un repertorio de dominios variables V_K unidos a un dominio V_H (simulado) de línea germinal para la unión a β -gal, y se selecciona un repertorio de dominios variables V_H unidos a un dominio V_K (simulado) de línea germinal para la unión a HSA. Los dominios variables seleccionados V_H HSA y V_K β -gal después se combinan y se seleccionan los anticuerpos para la unión a β -gal y HSA.

En este experimento se usaron 4 bibliotecas de anticuerpos humanos en fagos.

Biblioteca 1 línea germinal V_K /DVT V_H $8,46 \times 10^7$

Biblioteca 2 línea germinal V_K /NNK V_H $9,64 \times 10^7$

Biblioteca 3 línea germinal V_H /DVT V_K $1,47 \times 10^8$

Biblioteca 4 línea germinal V_H /NNK V_K $1,45 \times 10^8$

Todas las bibliotecas se basan en un marco conservado humano único para V_H (V3-23/DP47 y J_H4b) y V_K (O12/O2/DPK9 y J_K1) con diversidad de la cadena lateral incorporada en regiones determinantes de la complementariedad (CDR2 y CDR3).

La biblioteca 1 y biblioteca 2 contienen una secuencia V_K simulada, mientras que la secuencia de V_H está diversificada en las posiciones H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97 y H98 (codificadas por DVT o NNK, respectivamente) (Figura 1). La biblioteca 3 y la biblioteca 4 contienen una secuencia V_H simulada, mientras que la secuencia de V_K está diversificada en las posiciones L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96 (codificadas por DVT o NNK, respectivamente) (Figura 1). Las bibliotecas están en formato pIT2/ScFv de fagémido (Figura 2) y se han preseleccionado para la unión a ligandos genéricos, proteína A y proteína L, de modo que la mayoría de los clones en las bibliotecas no seleccionadas son funcionales.

Los tamaños de las bibliotecas mostradas antes corresponden a los tamaños después de la preselección. La biblioteca 1 y biblioteca 2 se mezclaron antes de las selecciones en el antígeno para dar una sola biblioteca de V_H/V_K simulado, y la biblioteca 3 y biblioteca 4 se mezclaron para formar una sola biblioteca de V_K/V_H simulado.

Se llevaron a cabo 3 ciclos de selecciones en β -gal usando la biblioteca de V_K/V_H simulado y se llevaron a cabo 3 ciclos de selecciones en HSA usando la biblioteca de V_H/V_K simulado. En el caso de β -gal, las valoraciones de fagos fueron desde $1,1 \times 10^6$ en el primer ciclo a $2,0 \times 10^8$ en el tercer ciclo. En el caso de HSA, las valoraciones de fagos fueron desde 2×10^4 en el primer ciclo a $1,4 \times 10^9$ en el tercer ciclo. Las selecciones se llevaron a cabo como describen Griffith y col., (1993), excepto que se usó el fago auxiliar KM13 (el cual contiene una proteína pIII con un sitio de escisión de proteasa entre los dominios D2 y D3) y

los fagos se eluyeron con tripsina 1 mg/ml en PBS. La adición de tripsina escinde las proteínas pIII derivadas del fago auxiliar (pero no las del fagémido) y eluye las fusiones de scFv-fago unidas por escisión en el marcador c-myc (figura 2), proporcionando así un enriquecimiento adicional para fagos que expresan los scFv funcionales y una correspondiente reducción de fondo (Kristensen y Winter, 1998). Las selecciones se llevaron a cabo usando inmunotubos recubiertos con HSA o β -gal en una concentración de 100 μ g/ml.

Para comprobar la unión, se cribaron 24 colonias del tercer ciclo de cada selección por ELISA de fagos monoclonales. Las partículas de fagos se produjeron como describen Harrison y col., (1996). Placas de ELISA de 96 pocillos se recubrieron con 100 μ l de HSA o β -gal en una concentración de 10 μ g/ml en PBS durante la noche a 4°C. Se siguió un protocolo de ELISA estándar (Hoogenboom y col., 1991) usando la detección de fagos unidos con conjugado anti-M13-HRP. Una selección de clones dio señales en ELISA mayores que 1,0 con 50 μ l de líquido sobrenadante (no se muestran los datos).

Después, las preparaciones de ADN se hicieron a partir de la biblioteca de V_H/V_K simulado seleccionada en HSA y a partir de la biblioteca de V_K/V_H simulado seleccionada en β -gal usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Para acceder a la mayor diversidad, las preparaciones de ADN se hicieron a partir de cada uno de los tres ciclos de selecciones y después se mezclaron entre sí para cada uno de los antígenos. Después las preparaciones de ADN se digirieron con SalI/NotI durante la noche a 37°C. Después de purificación en gel de los fragmentos, las cadenas de V_K de la biblioteca de V_K/V_H simulado seleccionadas en β -gal se ligaron en el lugar de una cadena de V_K simulado de la biblioteca de V_H/V_K simulado seleccionada en HSA creando una biblioteca de $3,3 \times 10^9$ clones.

Después, esta biblioteca se seleccionó en HSA (primer ciclo) y β -gal (segundo ciclo), selección HSA/ β -gal, o en β -gal (primer ciclo) y HSA (segundo ciclo), selección β -gal/HSA. Las selecciones se llevaron a cabo como se ha descrito antes. En cada caso, después del segundo ciclo, se ensayó en 48 clones la unión a HSA y β -gal por el ELISA de fagos monoclonales (como se ha descrito antes) y por ELISA de los fragmentos scFv solubles. Los fragmentos de anticuerpo solubles se produjeron como describen Harrison y col., (1996), y se siguió el protocolo de ELISA estándar (Hoogenboom y col., 1991), excepto que se usó Tween al 2%/PBS como tampón de bloqueo y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Tres clones (E4, E5 y E8) de la selección HSA/ β -gal y dos clones (K8 y K10) de la selección β -gal/HSA eran capaces de unir ambos antígenos (no se muestran los datos). Los scFv de estos clones se amplificaron por PCR y se secuenciaron como describen Ignatovich y col., (1999) usando los cebadores LMB3 y pHENseq (Tabla 1). El análisis de la secuencia puso de manifiesto que todos los clones eran idénticos. Por lo tanto, solo se eligió un clon que

codificaba un anticuerpo de doble especificidad (K8) para el trabajo posterior (figura 3).

Ejemplo 2. Caracterización de las propiedades de unión del anticuerpo K8.

El primer lugar se caracterizaron las propiedades de unión del anticuerpo K8 por el ELISA de fagos monoclonales. Una placa de 96 pocillos se recubrió con 100 μ l de HSA y β -gal
 5 junto con fosfatasa alcalina (APS), albúmina de suero bovino (BSA), aglutinina de cacahuete, lisozima y citocromo c (para comprobar la reactividad cruzada) en una concentración de 10 μ g/ml en PBS, durante la noche a 4°C. El fagémido del clon K8 se rescató con KM13 como describen Harrison y col., (1996). y se ensayó directamente el líquido sobrenadante (50 μ l) que contenía fagos. Se siguió un protocolo de ELISA estándar (Hoogenboom y col., 1991) usando
 10 la detección de fagos unidos con conjugado anti-M13-HRP. Se encontró que el anticuerpo K8 de doble especificidad se unía a HSA y β -gal cuando se presenta en la superficie del fago, con señales mayores que 1,0 (figura 4). También se observó una unión fuerte a la BSA (figura 4). Puesto que la HSA y la BSA son 76% homólogas a nivel de aminoácidos, no es sorprendente que el anticuerpo K8 reconozca ambas proteínas estructuralmente relacionadas. No se detectó
 15 reactividad cruzada con otras proteínas (figura 4).

En segundo lugar, se ensayaron las propiedades de unión del anticuerpo K8 en un ELISA de scFv soluble. La producción del fragmento scFv soluble se indujo mediante IPTG como describen Harrison y col., (1996). Para determinar los niveles de expresión de scFv de K8, los fragmentos de anticuerpo solubles se purificaron del líquido sobrenadante de
 20 inducciones de 50 ml usando columnas de Proteína A-Sepharosa como describen Harlow y Lane (1988). Después, se midió la DO_{280} y se calculó la concentración de proteína como describen Sambrook y col., (1989). El scFv de K8 se produjo en el líquido sobrenadante en 19 mg/ml.

Después se llevó a cabo un ELISA de scFv soluble usando concentraciones conocidas del fragmento del anticuerpo K8. Se recubrió una placa de 96 pocillos con 100 μ l de HSA, BSA y β -gal de 10 μ g/ml y 100 μ l de Proteína A de 1 μ g/ml de concentración. Se aplicaron 50 μ l de diluciones seriadas del scFv de K8 y los fragmentos de anticuerpo unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Los resultados de ELISA confirmaron la naturaleza de doble especificidad del anticuerpo K8 (figura 5).

30 Para confirmar esto, se determinó la unión a β -gal por el dominio V_k y la unión a HSA/BSA por el dominio V_H del anticuerpo scFv de K8, se cortó el dominio V_k del ADN de scFv de K8 mediante digestión por SalI/NotI y se ligó en un vector pIT2 digerido con SalI/NotI que contiene la cadena de V_H simulado (figuras 1 y 2). Las características de unión del clon resultante KBV_k/V_H simulado, por ELISA de scFv soluble. La producción de los fragmentos
 35 scFv solubles se indujo mediante IPTG como describen Harrison y col., (1996), y se ensayó

directamente el líquido sobrenadante (50 μ l) que contenía los scFv. El ELISA de scFv soluble se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1, y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Los resultados del ELISA pusieron de manifiesto que este clon todavía podía unirse a β -gal, mientras que se había abolido la unión a BSA (figura 6).

Ejemplo 3. Creación y caracterización de los anticuerpos scFv de doble especificidad (K8V_K/V_{H2} y KBV_K/V_{H4}) dirigidos contra APS y β -gal y de un anticuerpo scFv de doble especificidad (K8V_K/V_HC11) dirigido contra la proteína BCL10 y β -gal.

Este ejemplo describe un procedimiento para hacer anticuerpos scFv de doble especificidad (K8V_K/V_{H2} y KBV_K/V_{H4}) dirigidos contra APS y β -gal y de un anticuerpo scFv de doble especificidad (K8V_K/V_HC11) dirigido contra la proteína BCL10 y β -gal, por el cual se selecciona primero un repertorio de dominios variables V_H unidos a un dominio V_K (simulado) de línea germinal para la unión a APS y la proteína BCL10. Los dominios V_H individuales seleccionados (V_{H2}, V_{H4} y V_HC11) después se combinan con un dominio V_K de unión a β -gal individual (de scFv de K8, ejemplos 1 y 2) y se analiza la doble especificidad de los anticuerpos.

Se usó una biblioteca de scFv de V_H/V_K simulado descrita en el ejemplo 1, para llevar a cabo 3 ciclos de selecciones en APS y 2 ciclos de selecciones en proteína BCL10. La proteína BCL10 está implicada en la regulación de la apoptosis y se encuentran formas mutantes de esta proteína en múltiples tipos de tumores, lo que indica que la BCL10 puede estar normalmente implicada en la patogénesis del cáncer humano (Willis y col., 1999).

En el caso de la APS, las valoraciones de fagos fueron desde $2,8 \times 10^5$ en el primer ciclo hasta $8,0 \times 10^8$ en el tercer ciclo. En el caso de la BCL10 las valoraciones de fagos fueron desde $1,8 \times 10^5$ en el primer ciclo hasta $9,2 \times 10^7$ en el segundo ciclo. Las selecciones se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 1, usando inmunotubos recubiertos con APS o BCL10 de 100 μ g/ml de concentración.

Para comprobar la unión, se cribaron 24 colonias del tercer ciclo de selecciones en APS y 48 colonias del segundo ciclo de las selecciones en BCL10 por ELISA de scFv soluble. Se recubrió una placa de 96 pocillos con 100 μ l de APS, BCL10, BSA, HSA y β -gal en una concentración de 10 μ g/ml en PBS durante la noche a 4°C. La producción de los fragmentos de scFv solubles se indujo mediante IPTG como describen Harrison y col., (1996) y el líquido sobrenadante (50 μ l) que contenía los scFv se ensayó directamente. El ELISA de scFv soluble se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1 y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Se encontró que dos clones (V_{H2} y V_{H4}) se unían a la APS y un clon (V_HC11) era específico para la BCL10 (figuras 3, 7). No se observó reactividad cruzada con otras proteínas.

Para crear anticuerpos de doble especificidad, cada uno de estos clones se digirió con

Sal//Not/ para separar las cadenas de V_K simulado y en su lugar se ligó un fragmento Sal//Not/ que contenía el dominio V_K de unión a β -gal de scFv de K8. Las características de unión de los clones producidos (KSV_K/V_{H2} , KBV_K/V_{H4} y KSV_K/V_{HC11}) se analizaron en un ELISA de scFv soluble como se ha descrito antes. Se encontró que todos los clones tenían doble

5 especificidad sin ninguna reactividad cruzada con otras proteínas (figura 8).

Ejemplo 4. Creación y caracterización de anticuerpos de dominio V_H único (V_{H2sd} y V_{H4sd}) dirigidos contra la APS.

Este ejemplo demuestra que los dominios variables V_{H2} y V_{H4} dirigidos contra la APS (descrito en el ejemplo 3) pueden unir este antígeno en ausencia de un dominio variable

10 complementario.

Las preparaciones de ADN de los clones de scFv de V_{H2} y V_{H4} (descritos en el ejemplo 3) se digirieron con Nco//Xho/ para cortar los dominios V_H (figura 2). Después, estos dominios se ligaron en un vector pIT1 digerido con Nco//Xho/ (figura 2) para crear la fusión del dominio

único V_H con el gen III.

Después se analizaron las características de unión de los clones producidos (V_{H2sd} y V_{H4sd}) por ELISA de fagos monoclonales. Las partículas de fagos se produjeron como describen Harrison y col., (1996). Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos con 100 μ l de APS, BSA, HSA, β -gal, ubiquitina, α -amilasa y miosina en una concentración de 10 μ g/ml en PBS durante la noche a 4°C. Se siguió un protocolo de ELISA estándar (Hoogenboom y col.,

20 1991) usando detección del fago unido con conjugado anti-M13-HRP. Los resultados del ELISA demostraron que los dominios únicos V_H reconocían específicamente la APS cuando se presentaba en la superficie del bacteriófago filamentoso (figura 9). El ELISA de V_{H2sd} y V_{H4sd} solubles dio los mismos resultados que el ELISA de fagos, indicando que estos dominios únicos son capaces de reconocer la APS como fragmentos solubles (figura 10).

Ejemplo 5. Selección de anticuerpos de dominio V_H único dirigidos contra la APS y anticuerpos de dominio V_K único dirigidos contra β -gal de un repertorio de dominios únicos de anticuerpos.

Este ejemplo describe un procedimiento para hacer anticuerpos de dominio V_H único dirigidos contra la APS y anticuerpos de dominio V_K único dirigidos contra la β -gal, por

30 selección de repertorios de dominios variables únicos de anticuerpos vírgenes para la unión a estos antígenos en ausencia de dominios variables complementarios.

En este experimento se usaron dos bibliotecas de anticuerpos en fagos humanos.

Biblioteca 5 NNK dominio único V_H 4,08 x 10⁸

Biblioteca 6 NNK dominio único V_K 2,88 x 10⁸

Las bibliotecas se basan en un marco conservado humana única para V_H (V3-23/DP47

35

y J_H4b) y V_K (O12/O2/DPK9 y J_K1) con diversidad en la cadena lateral incorporada en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR2 y CDR3). La secuencia de V_H en la biblioteca 5 (estando ausente el dominio variable V_K complementario) está diversificada en las posiciones H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97 y H98 (codificado por NNK).

5 La secuencia V_K en la biblioteca 6 (estando ausente el dominio variable V_H complementario) está diversificada en las posiciones L50, L53, L91, L92, L93, L94 y L96 (codificado por NNK) (Figura 1). Las bibliotecas están en formato de fagémido pIT1/dominio variable único (Figura 2).

10 Se llevaron a cabo 2 ciclos de selecciones en APS y β-gal usando la biblioteca 5 y la biblioteca 6, respectivamente. En el caso de la APS, la valoración de fagos iba desde $9,2 \times 10^5$ en el primer ciclo hasta $1,1 \times 10^8$ en el segundo ciclo. En el caso de β-gal, la valoración de fagos iba desde $2,0 \times 10^6$ en el primer ciclo hasta $1,6 \times 10^8$ en el segundo ciclo. Las selecciones se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 1, usando inmunotubos recubiertos con APS o β-gal en una concentración de 100 μg/ml.

15 Después del segundo ciclo, se analizó en 48 clones de cada selección la unión a sus respectivos antígenos en un ELISA de dominio único soluble. Se recubrieron placas de 96 pocillos con 100 μl de APS y BSA (control negativo) para cribar los clones seleccionados de la biblioteca 5 y con 100 μl de β-gal y BSA 10 μg/ml (control negativo) para cribar los clones seleccionados de la biblioteca 6. La producción de los fragmentos de dominios únicos V_K y V_H solubles se indujo mediante IPTG como describen Harrison y col., (1996) y el líquido sobrenadante (50 μl) que contenía los dominios únicos se ensayó directamente. El ELISA de dominio único soluble se llevó a cabo como el ELISA de scFv soluble descrito en el ejemplo 1, y los dominios únicos V_K y V_H unidos se detectaron con Proteína L-HRP y Proteína A-HRP, respectivamente. Se encontró que 5 dominios únicos V_H (V_HA10sd, V_HA1sd, V_HA5sd, V_HC5sd y V_HC11sd) seleccionados de la biblioteca 5 unían la APS y se encontró que un dominio único V_K (V_KE5sd) seleccionado de la biblioteca 6 unía la β-gal. Ninguno de los clones tenía reactividad cruzada con la BSA (figuras 3, 11).

Ejemplo 6. Creación y caracterización de anticuerpos scFv de doble especificidad (V_KE5/V_H2 y V_KE5/V_H4) dirigidos contra la APS y β-gal.

30 Este ejemplo demuestra que los anticuerpos scFv de doble especificidad (V_KE5/V_H2 y V_KE5/V_H4) dirigidos contra la APS y β-gal se podían crear combinando el dominio variable V_KE5sd que se seleccionó para la unión a β-gal en ausencia de un dominio variable complementario (como se describe en el ejemplo 5) con dominios variables V_H2 y V_H4 que se seleccionaron para la unión a la APS en presencia de dominios variables complementarios (como se describe en el ejemplo 3).

Para crear estos anticuerpos de doble especificidad, se digirió el fagémido pIT1 que contenía $V_{\kappa}E5sd$ (ejemplo 5) con $Nco//XhoI$ (figura 2). Los fragmentos $Nco//XhoI$ que contenían dominios variables V_H de los clones V_{H2} y V_{H4} (ejemplo 3) después se ligaron en el fagémido para crear los clones scFv $V_{\kappa}E5/V_{H2}$ y $V_{\kappa}E5/V_{H4}$, respectivamente.

5 Las características de unión de los clones producidos se ensayaron en un ELISA de scFv soluble. Una placa de 96 pocillos se recubrió con 100 μ l de APS, β -gal y BSA (control negativo) de 10 μ g/ml de concentración en PBS durante la noche a 4°C. La producción de los fragmentos scFv solubles se indujo mediante IPTG como describen Harrison y col., (1996) y el líquido sobrenadante (50 μ l) que contenía los scFv se ensayó directamente. El ELISA de scFv
10 soluble se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1, y los scFv unidos se detectaron con Proteína L-HRP. Se encontró que tanto los clones $V_{\kappa}E5/V_{H2}$ como $V_{\kappa}E5/V_{H4}$ tenían doble especificidad. No se detectó reactividad cruzada con BSA (figura 12).

Ejemplo 7. Construcción de vectores para convertir los anticuerpos scFv de doble especificidad existentes en un formato Fab.

15 **a. Construcción del vector C_{κ} y el vector Ck/gIII.**

El gen de C_{κ} se amplificó por PCR a partir de un clon individual A4 seleccionado de una biblioteca de Fab (Griffith y col., 1994) usando Ck BACKNOT como un cebador 5' (inverso) y CKSACFORFL como un cebador 3' (directo) (tabla 1). Se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación de PCR como describen Ignatovich y col., (1997), excepto que se usó la
20 polimerasa *Pfu* como enzima. El producto de la PCR se digirió con $Not//EcoRI$ y se ligó en un vector pHEN14 V_{κ} digerido con $Not//EcoRI$ (figura 13) para crear un vector C_{κ} (figura 14).

Después el gen III se amplificó por PCR a partir de un vector pIT2 (figura 2) usando G3BACKSAC como un cebador 5' (inverso) y LMB2 como un cebador 3' (directo) (tabla 1). Se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación por PCR como antes. El producto de la PCR se
25 digirió con $Sac//EcoRI$ y se ligó a un vector C_{κ} digerido con $Sac//EcoRI$ (figura 14) para crear el fagémido Ck/gIII (figura 15).

b. Construcción del vector C_H .

El gen de C_H se amplificó por PCR a partir de un clon individual A4 seleccionado de una biblioteca de Fab (Griffith y col., 1994) usando CHBACKNOT como un cebador 5' (inverso)
30 y CHSACFOR como un cebador 3' (directo) (tabla 1). Se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación por PCR como antes. El producto de la PCR se digirió con $Not//BglII$ y se ligó a un vector PACYC4 V_H digerido con $Not//BglII$ (figura 16) para crear un vector C_H (figura 17).

Ejemplo 8. Construcción del clon Fab $V_{\kappa}E5/V_{H2}$ y comparación de sus propiedades de unión con la versión de scFv $V_{\kappa}E5/V_{H2}$ (Ejemplo 6).

35 Este ejemplo demuestra que se retiene la doble especificidad del anticuerpo scFv

V_KE5/V_H2 cuando los dominios variables V_K y V_H están situados en diferentes cadenas de polipéptidos. Además, la unión del clon Fab V_KE5/V_H2 a β-gal y APS se hace competitiva. En cambio, el anticuerpo scFv V_KE5/V_H2 puede unir ambos antígenos simultáneamente.

Para crear un Fab V_KE5/V_H2, se digirió ADN del clon scFv V_KE5/V_H2 con SalI/NotI y el
 5 fragmento de ADN purificado que contenía el dominio variable V_KE5 se ligó en un vector C_K digerido con SalI/NotI (figura 14). Los productos del ligado se usaron para transformar células TG-1 de *Escherichia coli* competentes como describen Ignatovich y col., (1997), y los transformantes (V_KE5/C_K) se hicieron crecer en placas TYE que contenían glucosa al 1% y ampicilina 100 µg/ml.

10 El ADN del clon scFv V_KE5/V_H2 también se digirió con SfiI/XhoI y el fragmento de ADN purificado que contenía el dominio variable V_H2 se ligó en un vector C_H digerido con SfiI/XhoI (figura 17). Los productos del ligado se usaron para transformar células TG-1 de *E. coli* competentes como antes y los transformantes (V_H2/C_H) se hicieron crecer en placas de TYE que contenían glucosa al 1% y cloranfenicol 10 µg/ml.

15 Después se hizo la preparación de ADN a partir del clon V_KE5/C_K y se usó para transformar el clon V_H2/C_H como describen Chung y col., (1989). Los transformantes se hicieron crecer en placas de TYE que contenían glucosa al 1%, ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 10 µg/ml.

20 El clon que contenía los plásmidos tanto V_KE5/C_K como V_H2/C_H se indujo después mediante IPTG para producir fragmentos Fab V_KE5/V_H2 solubles. Las inducciones se llevaron a cabo como describen Harrison y col., (1996), excepto que el clon se mantuvo en el medio que contenía dos antibióticos (ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 10 µg/ml) y después de la adición de IPTG la temperatura se mantuvo a 25°C durante la noche.

25 La unión de los Fab V_KE5/V_H2 solubles se analizó por ELISA. Una placa de 96 pocillos se recubrió con 100 µl de APS, β-gal y BSA (control negativo) de 10 µg/ml de concentración en PBS durante la noche a 4°C. El líquido sobrenadante (50 µl) que contenía los Fab se ensayó directamente. El ELISA de Fab soluble se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1 y los Fab unidos se detectaron con Proteína A-HRP. El ELISA demostró la naturaleza de doble especificidad del Fab V_KE5/V_H2 (figura 18).

30 El Fab V_KE5/V_H2 producido también se purificó de 50 ml de líquido sobrenadante usando Proteína A-Sepharosa como describen Harlow y Lane (1988) y se llevó a un gel de SDS-PAGE no reductor. La tinción del gel con Coomassie puso de manifiesto una banda de 50 kDa correspondiente a un fragmento Fab (no se muestran los datos).

35 Después se llevó a cabo un ELISA competitivo para comparar las propiedades de unión del Fab V_KE5/V_H2 y el scFv V_KE5/V_H2. Una placa de 96 pocillos se recubrió con 100 µl de β-gal

50

de 10 µg/ml de concentración en PBS durante la noche a 4°C. Se eligió una dilución de los líquidos sobrenadantes que contenían Fab V_kE5/V_H2 y scFv V_kE5/V_H2 de modo que se alcanzara una DO de 0,2 después de detección con Proteína A-HRP. Se incubaron 50 µl de los líquidos sobrenadantes diluidos de Fab V_kE5/V_H2 y scFv V_kE5/V_H2 durante 1 hora a temperatura ambiente con 36, 72 y 180 µmoles de APS nativa o APS que se había desnaturalizado por calentamiento a 70°C durante 10 min y después enfriado inmediatamente sobre hielo. Como control negativo, se sometieron 50 µl de los líquidos sobrenadantes diluidos de Fab V_kE5/V_H2 y scFv V_kE5/V_H2 a la misma incubación con BSA nativa o desnaturalizada. Después de estas incubaciones las mezclas se pusieron sobre una placa de ELISA recubierta con β-gal y se incubaron durante otra hora. Los fragmentos Fab V_kE5/V_H2 y scFv V_kE5/V_H2 se detectaron con Proteína A-HRP.

El ELISA demostró que el dominio variable V_H2 reconoce la forma desnaturalizada de la APS (figura 19). Este resultado se confirmó por experimentos de BIAcore cuando ninguna de las construcciones que contenían el dominio variable V_H2 eran capaces de unirse al chip recubierto con APS (no se muestran los datos). El ELISA también mostró claramente que se lograba una competición muy eficaz con APS desnaturalizada para el fragmento Fab V_kE5/V_H2, mientras que en el caso de scFv V_kE5/V_H2 la unión a β-gal no se veía afectada por el antígeno en competencia (figura 19). Esto se podría explicar por el hecho de que scFv representa una estructura más abierta en la que los dominios variables V_k y V_H se pueden comportar de forma independiente. Dicha libertad podría estar restringida en un formato Fab.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando de doble especificidad que comprende un dominio variable único de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una especificidad de unión a un primer antígeno o epítopo y un dominio variable único de cadena ligera de inmunoglobulina complementaria que tiene una especificidad de unión a un segundo antígeno o epítopo, en el que dichos dominios no comparten la misma especificidad, y en el que los dominios variables unen sus respectivos antígenos o epítopos simultáneamente.
2. El ligando de doble especificidad de la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo epítopos están presentes en diferentes antígenos.
3. El ligando de doble especificidad de la reivindicación 1, en el que el primero y el segundo epítopos están presentes en el mismo antígeno.
4. Un ligando de doble especificidad según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los V_H y V_L los proporciona un fragmento scFv de anticuerpo.
5. Un ligando de doble especificidad según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los V_H y V_L los proporciona una región Fab de anticuerpo.
6. Una IgG que comprende un ligando de doble especificidad de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Un ligando de doble especificidad según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las regiones variables están asociadas de forma no covalente.
8. Un ligando de doble especificidad según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las regiones variables están asociadas de forma covalente.
9. Un ligando de doble especificidad según la reivindicación 8, en el que la asociación covalente está mediada por enlaces disulfuro.
10. Un ligando de doble especificidad según cualquier reivindicación precedente, que comprende un marco conservado universal.

11. Un ligando de doble especificidad según la reivindicación 10, en el que el marco conservado universal comprende un marco conservado V_H seleccionado del grupo constituido por DP47, DP45 y DP38; y/o el marco conservado V_L es DPK9.
- 5 12. Un ligando de doble especificidad según cualquier reivindicación precedente, que comprende el sitio de unión para un ligando genérico específico.
13. Un ligando de doble especificidad según cualquier reivindicación precedente, en el que una especificidad del mismo es por un agente eficaz para aumentar la semivida del ligando.
- 10 14. Un ligando de doble especificidad según cualquier reivindicación precedente, que tiene una especificidad por un antígeno seleccionado de proteínas humanas y animales, citocinas, receptores de citocinas, cofactores enzimáticos para enzimas y proteínas de unión a ADN.
- 15 15. Un ligando de doble especificidad según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que tiene especificidad por un antígeno seleccionado de ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos-10 (30), ligando FLT3, fractalcina (CX3C), GDNF, GCSF, GM-CSF, GF- β 1, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL- α , IL-1 β , IL-2, IL-3; IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 aa), IL-8 (77 aa), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), inhibina α , inhibina β , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, leptina, LIF, linfotactina, sustancia inhibidora mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atractora de monocitos (30 véase antes), M-CSF, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 aa), MDC (69 aa), MIG, MIP- 1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, factor inhibidor de progenitores mieloides-1 (MPLF-1), NAP-2, neurturina, factor de crecimiento nervioso, β -NGF, NT-3, NT-4, oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , receptor de TNF I, receptor de TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor de VEGF 1, receptor de VEGF 2, receptor de VEGF 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3 y HER 4.
- 20 16. Un ligando de doble especificidad según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que tiene una especificidad por un receptor para una citocina indicada en la reivindicación 15.
- 25 17. Un ligando de doble especificidad según la reivindicación 3, en el que el antígeno es un
- 30

antígeno indicado en la reivindicación 15 ó 16.

18. Ácido nucleico que codifica al menos un ligando de doble especificidad según cualquier reivindicación precedente.

5

19. Un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 18.

20. Un vector según la reivindicación 19, que además comprende los componentes necesarios para la expresión de un ligando de doble especificidad.

10

21. Un procedimiento para producir un ligando de doble especificidad según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende un primer dominio variable único de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una primera especificidad de unión y un segundo dominio variable único de cadena ligera de inmunoglobulina complementario que tiene una segunda especificidad de unión, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

15

a) seleccionar un primer dominio variable por su capacidad para unirse a un primer epítipo,

b) seleccionar un segundo dominio variable por su capacidad para unirse a un segundo epítipo,

20

c) combinar los dominios variables; y

d) seleccionar el ligando de doble especificidad por su capacidad para unirse a dichos primer y segundo epítipos.

22. Un procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicho primer dominio variable se selecciona para la unión a dicho primer epítipo en ausencia de un dominio variable complementario.

25

23. Un procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicho primer dominio variable se selecciona para la unión a dicho primer epítipo en presencia de un tercer dominio variable complementario, en el que dicho tercer dominio variable es diferente de dicho segundo dominio variable.

30

24. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que las regiones variables derivan de inmunoglobulinas dirigidas contra dichos epítipos.

35

25. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que dichos primer y segundo epítomos están presentes en antígenos separados.
26. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que dichos primer y segundo epítomos están presentes en el mismo antígeno.
27. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en el que el dominio variable deriva de un repertorio de dominios de anticuerpos únicos.
28. Un procedimiento de la reivindicación 27, en el que dicho repertorio se presenta en la superficie de un bacteriófago filamentosos y en el que los dominios únicos de anticuerpos se seleccionan por la unión del repertorio en el bacteriófago a un antígeno.
29. Un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 28 precedentes, en el que la secuencia de al menos un dominio variable se modifica por mutación o barajado de ADN.

Figura 1

56

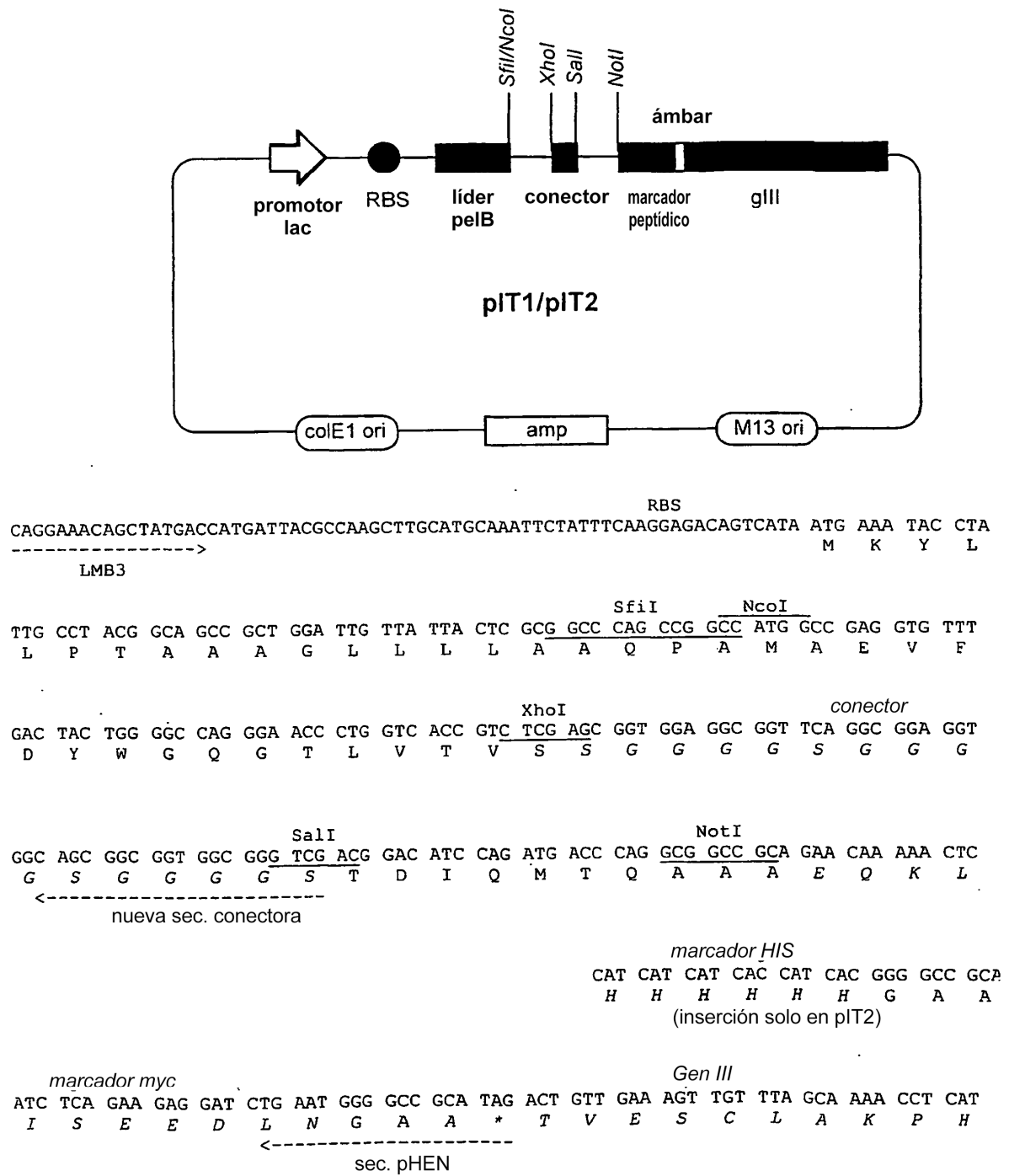


Figura 2

Cadenas VH

57

	FR1			CDR1			FR2			CDR2			FR3			CDR3			FR4
	1	2	3				4			5	6		7	8	9		10		11
VH simulado	123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	0123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345	67890123456789012345
K8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGGSGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYIQMNSLR	AEEDTAIVYYCAK	SYGAPDY	WGQGLTVTVSS											
VH2	-----	-----	-----	H-SPY-AN-R-----	-----	-----	GLRA---	-----											
VH4	-----	-----	-----	D-GAT-SK-G---P---	-----	-----	KVLT---	-----											
VHC11	-----	-----	-----	R-NGP-*A-G-----	-----	-----	HGAP---	-----											
VHA10sd	-----	-----	-----	S-PAS-LH-R-----	-----	-----	PGLG---	-----											
VHA1sd	-----	-----	-----	D-ERT-Y*-R-----	-----	-----	KVLV---	-----											
VHA1sd	-----	-----	-----	E-SAN-SK-Q-----	-L-----	-----	KVLQ---	-----											
VHA1sd	-----	-----	-----	T-PAN-*V-R-----	-----	-----	SLIQ---	-----											
VHC1sd	-----	-----	-----	D-AAT-SA-S-----	-----	-----	KLLK---	-----											
VHC1sd	-----	-----	-----	T-SSV-QS-R-----	-----	-----	NLMS---	-----											

Cadenas VK

	FR1			CDR1			FR2			CDR2			FR3			CDR3			FR4
	1	2	3				4			5	6		7	8	9		10		
VK simulado	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456	78901234567890123456789012345678	901234567	89012345678												
K8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	RASQSISSYLN	WYQOKPGKAPKLLIY	AASSLOS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSISTPNT	FGQGTKEIKR												
E5sd	-----	-----	-----	R-H---	-----	-----	-----												
C3	-----	-----	-----	L-R---	-----	-----	NMHL-P-												
	-----	-----	-----	*-L---	-----	-----	RYVD-L-												

Figura 3

1,421
0,06
1,159
0,068
1,338
0,067
0,076

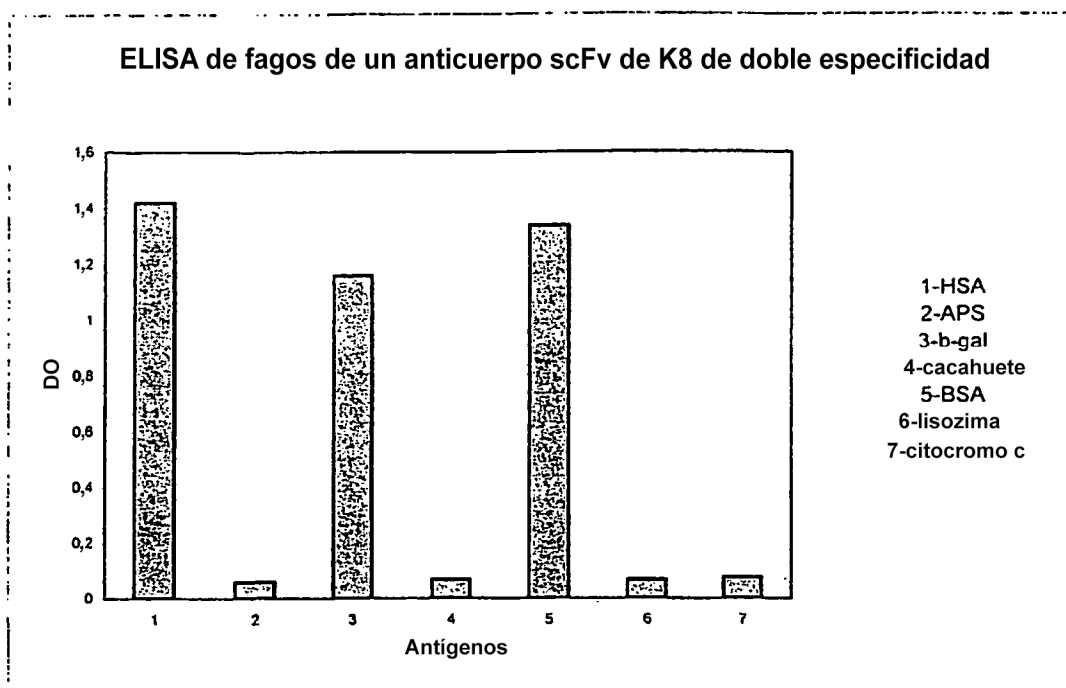


Figura 4

ELISA del anticuerpo scFv de K8 de doble especificidad soluble

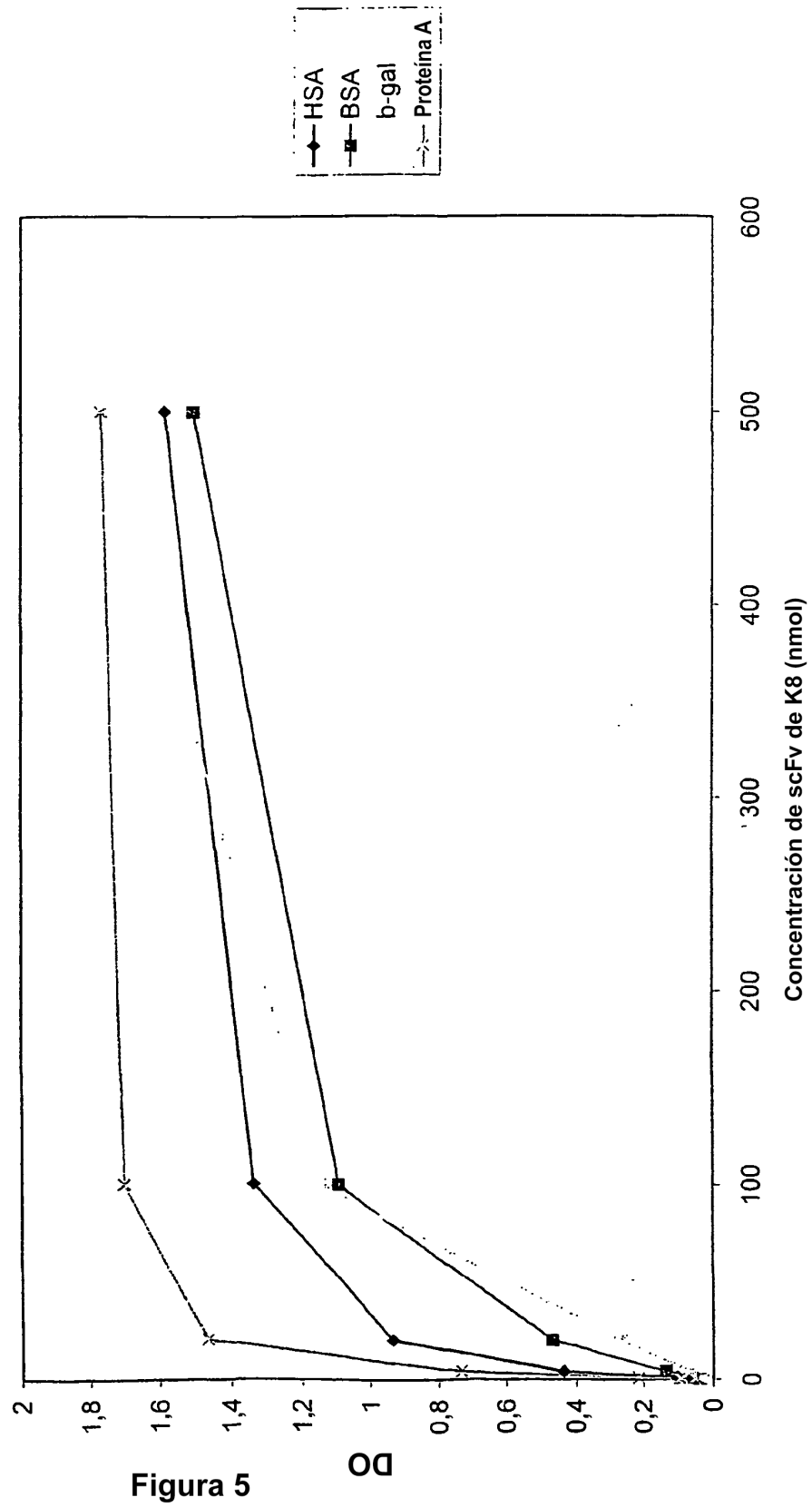


Figura 5

0.018
1.422
0.016
1.5

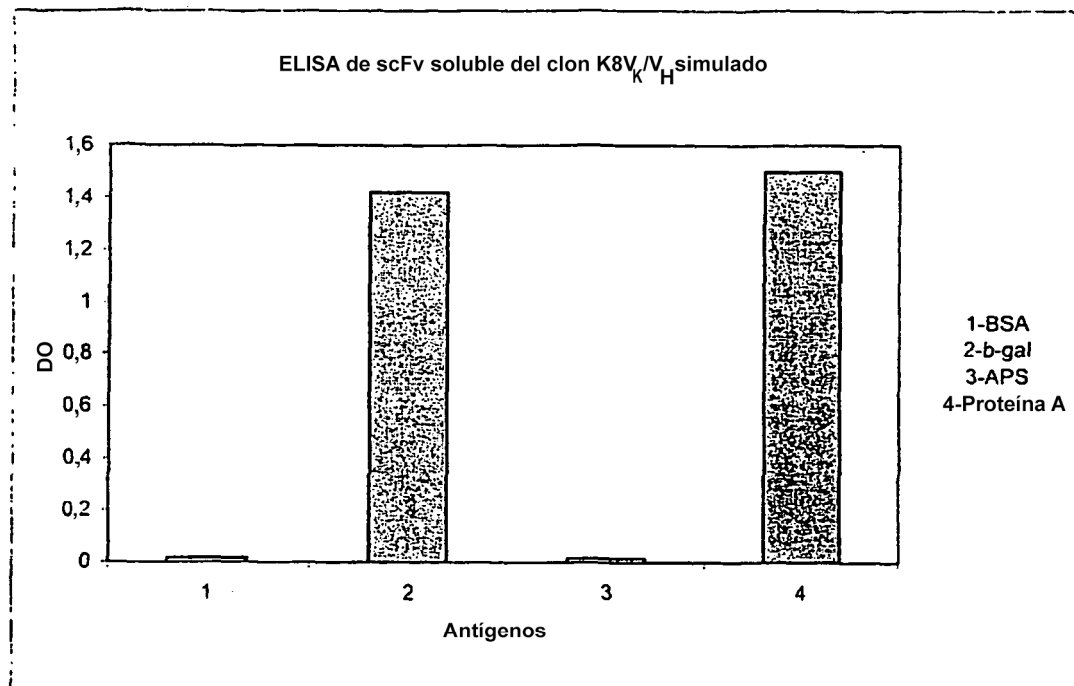


Figura 6

ELISA de scFv soluble de los clones VH2, VH4 y VHC11

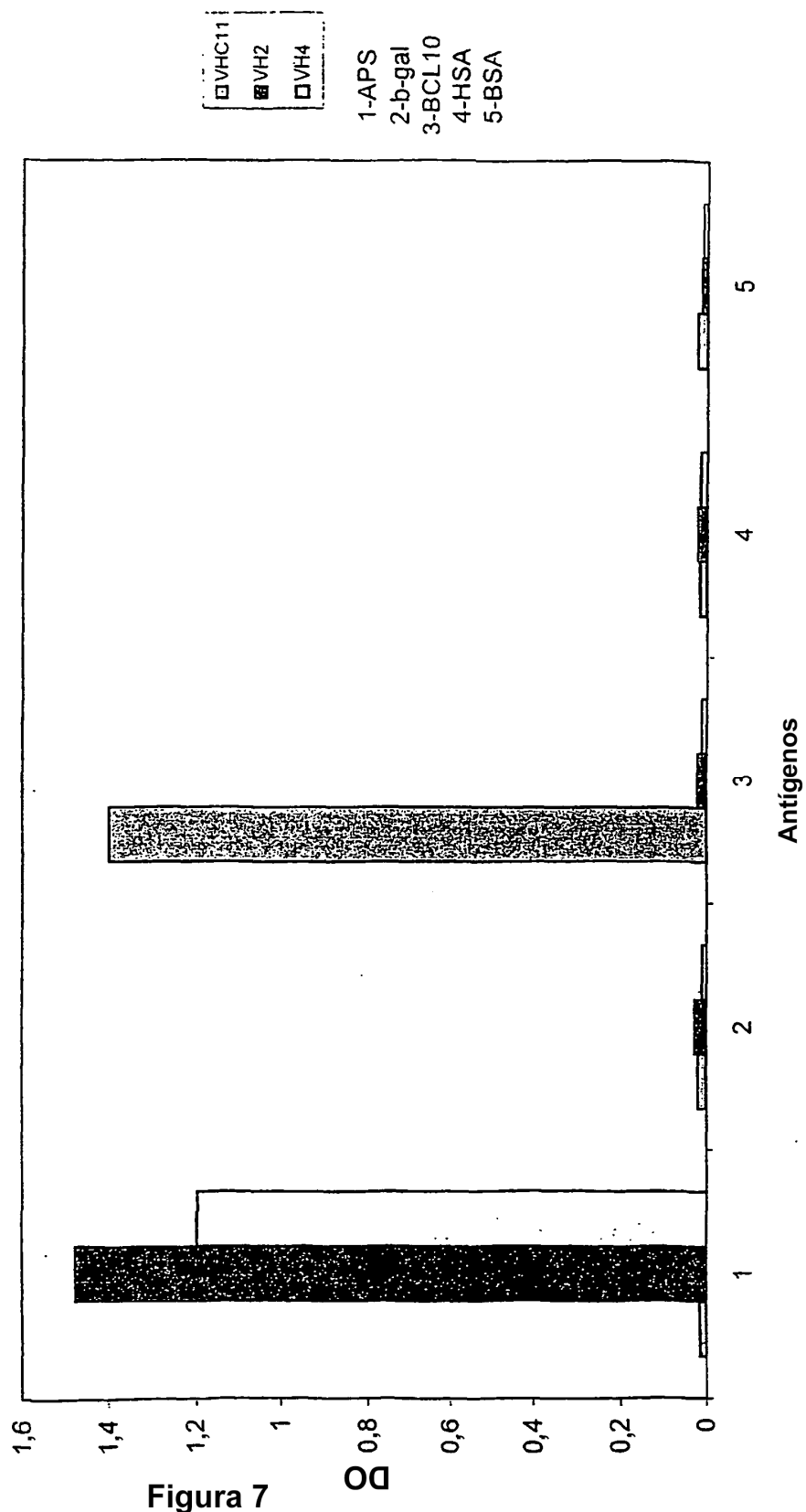


Figura 7

K8Vk/VH2	K8Vk/VH4	K8Vk/VHC11
1.506	1.724	0.017
0.624	1.367	0.947
0.017	0.034	0.604
0.02	0.02	0.033
0.013	0.02	0.052

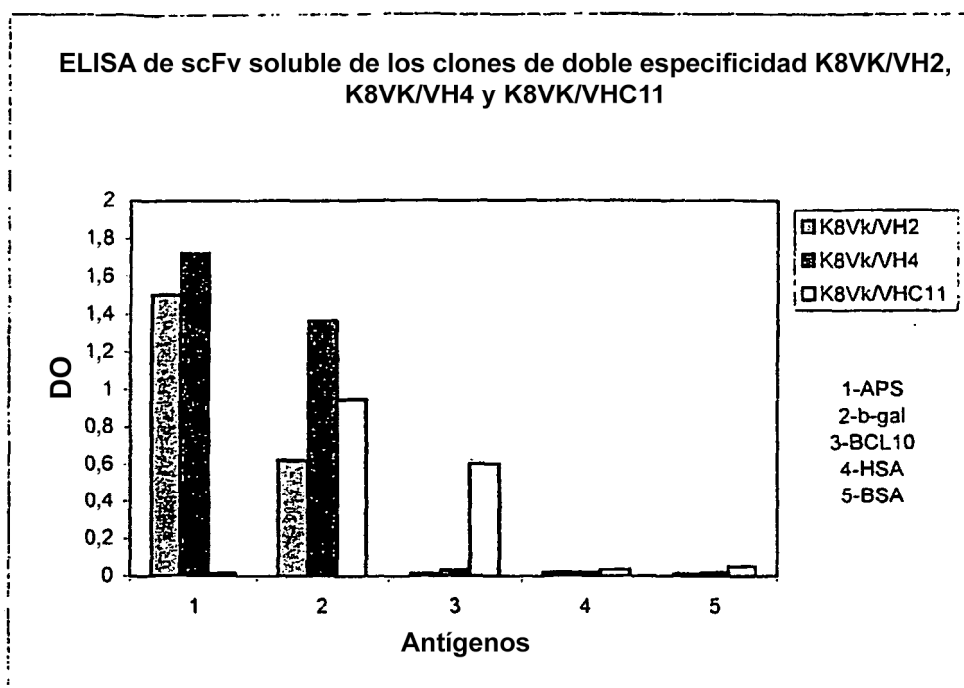


Figura 8

63

ELISA de fagos de los clones de dominio único VH2sd y VH4sd

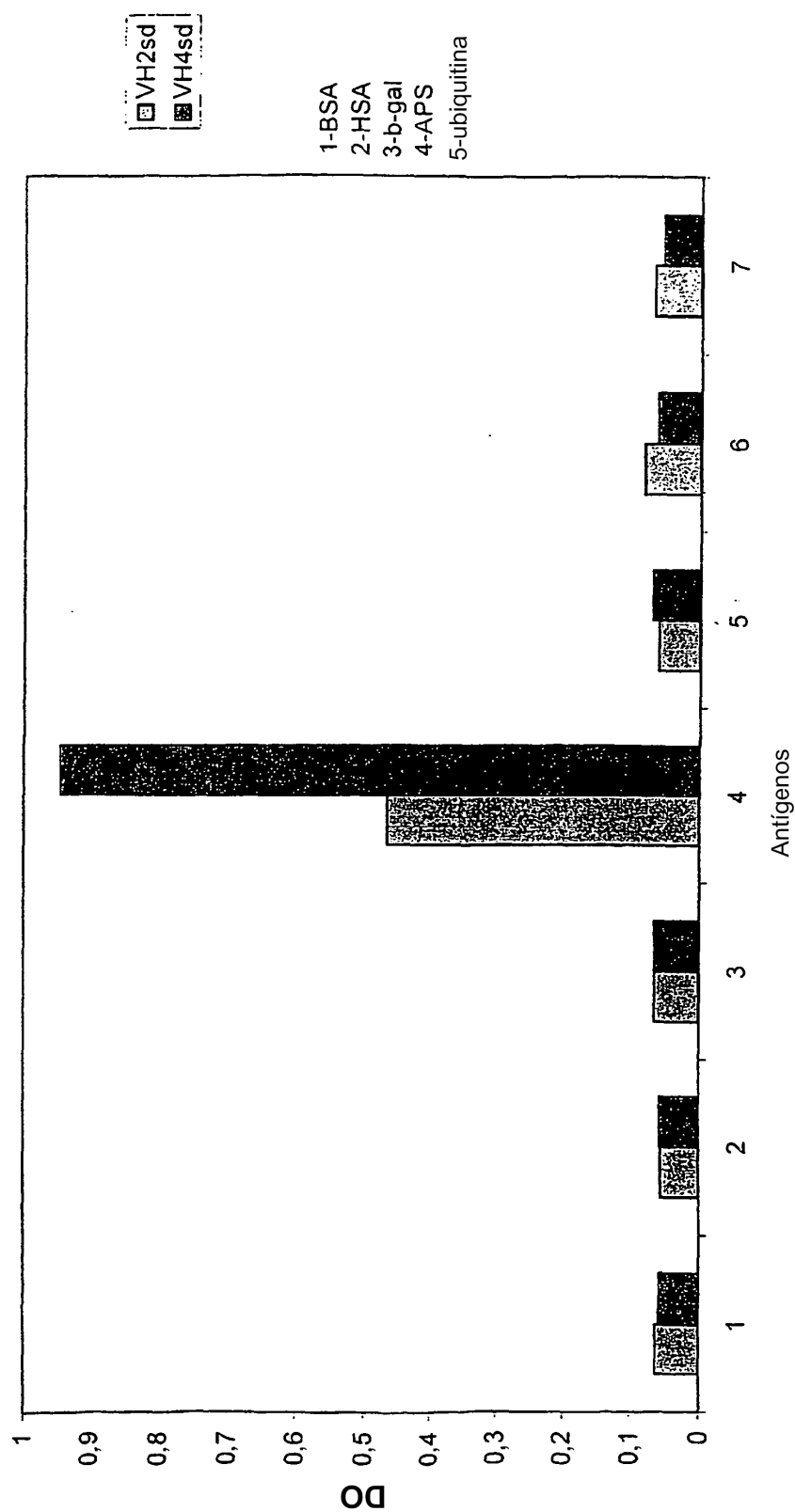


Figura 9

VH2sd	VH4sd
0,02	0,014
0,035	0,029
0,058	0,049
1,375	1,414
0,022	0,02
0,032	0,034
0,046	0,042

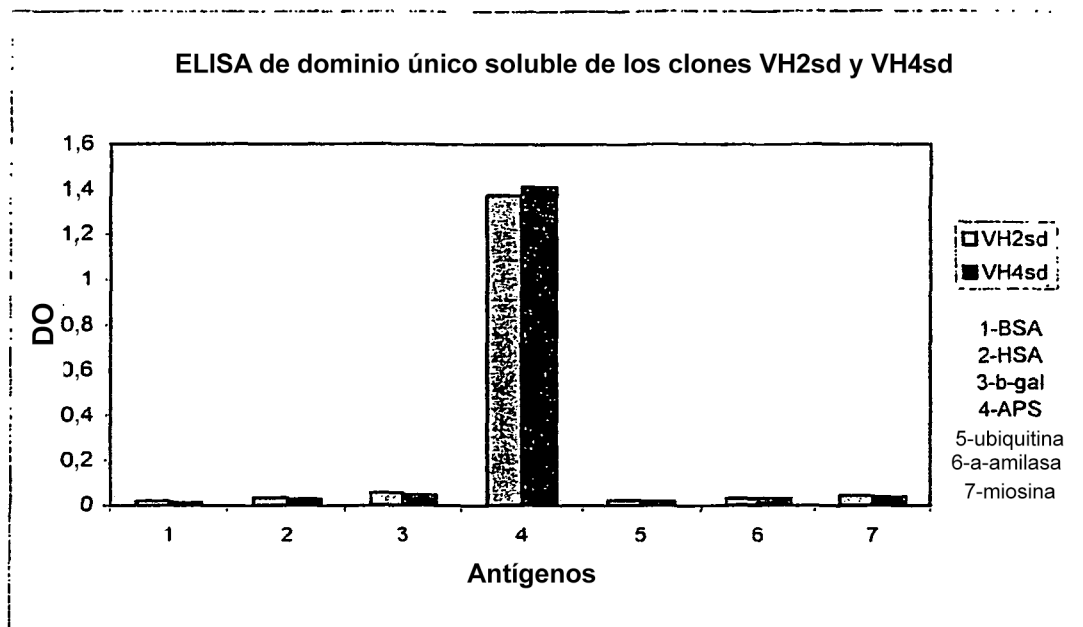


Figura 10

Figura 11

Antígeno	1	2	3
VhA10sd	0.00	0.05	1.05
VhA1sd	1.50	0.00	0.00
VhA5sd	1.65	0.00	0.00
VhC5sd	1.40	0.00	0.00
VhC11sd	1.80	0.00	0.00
VhE5sd	0.00	0.00	0.00

VkE5/Vh2	VkE5/Vh4
0,014	0,016
0,472	1,018
1,69	2,017

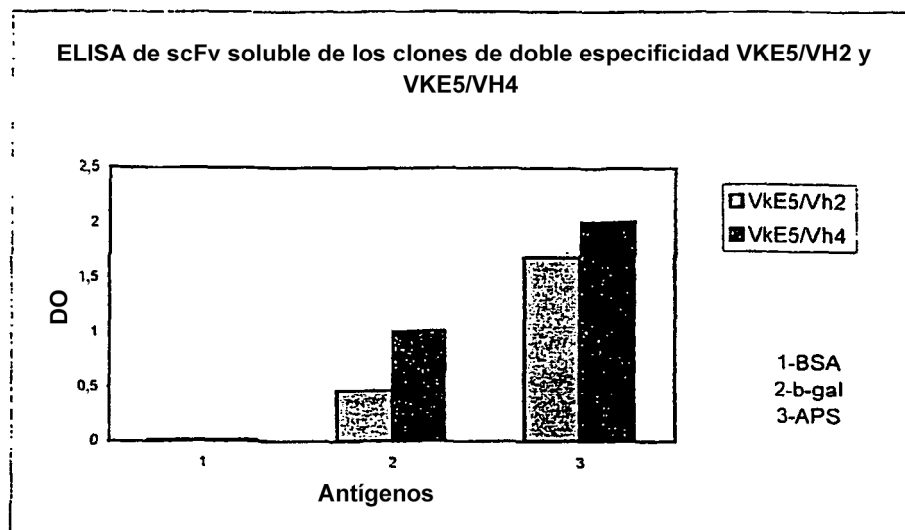
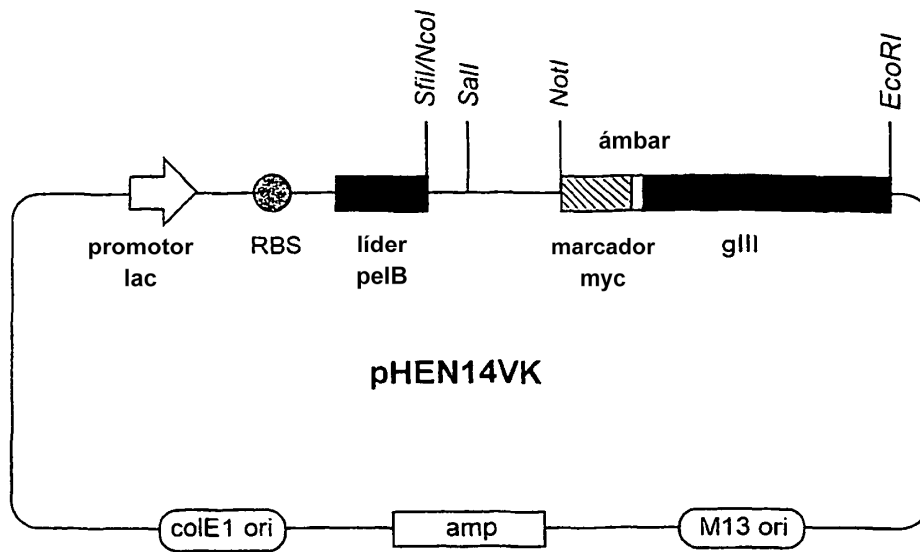


Figura 12

67



RBS

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATA ATG AAA TAC C
 -----> M K Y

LMB3

SfiI NcoI SalI

TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCG TCG ACG GA
 L P T A A A G L L L L A A Q P A M A S T D

NotI marcador myc

ATC CAG ATG ACC CAG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GC
 I Q M T Q A A A E Q K L I S E E D L N G A

gen III

GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT
 A O T V E S C L A K P H

<-----
 sec. pHEN

Figura 13

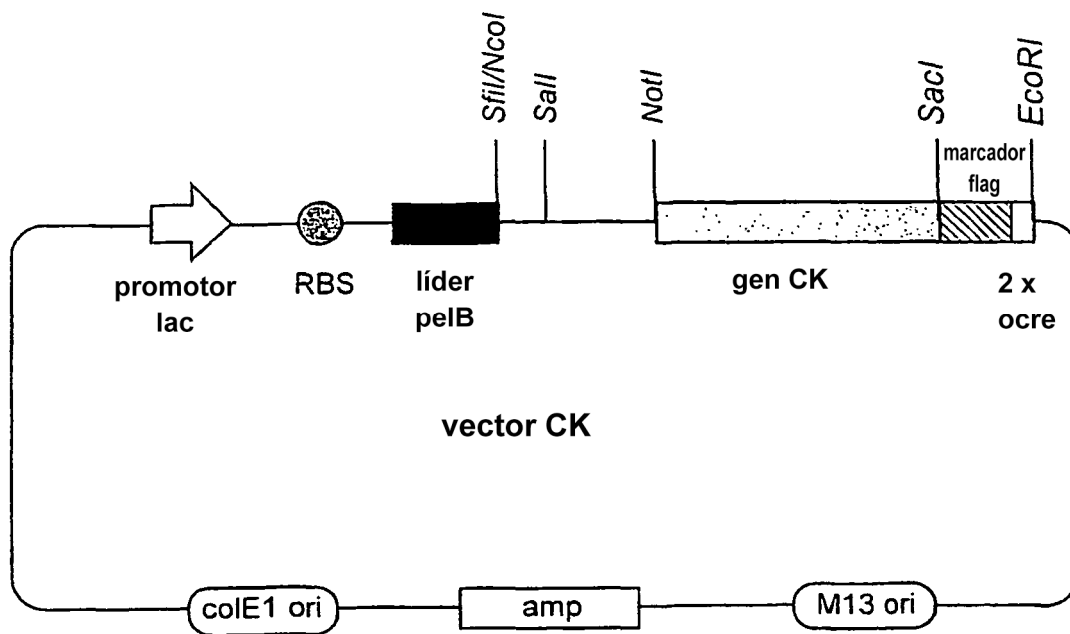


Figura 14

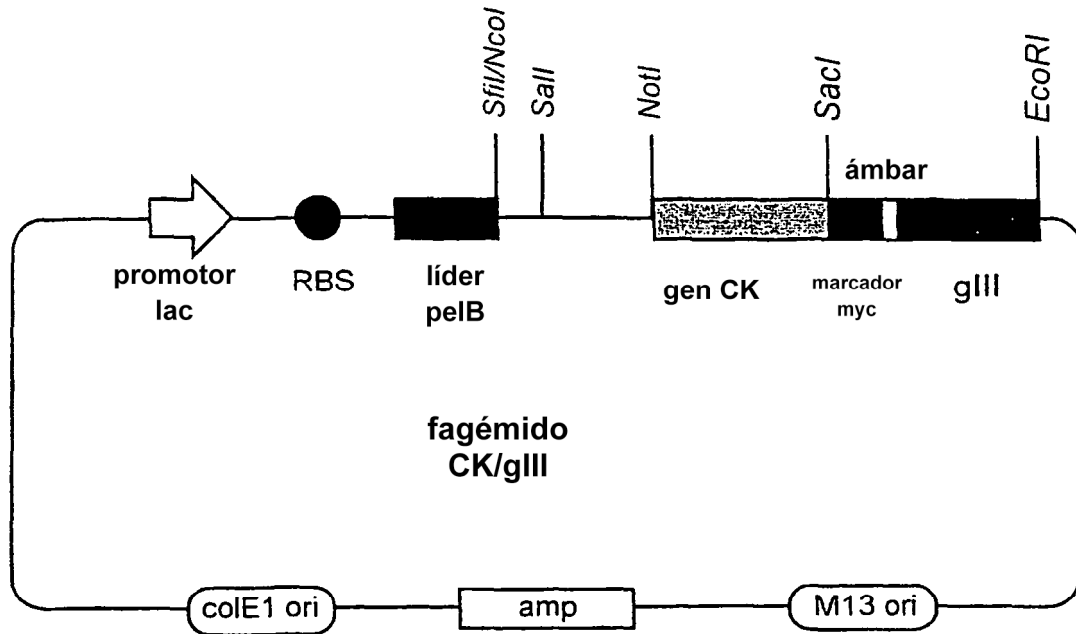
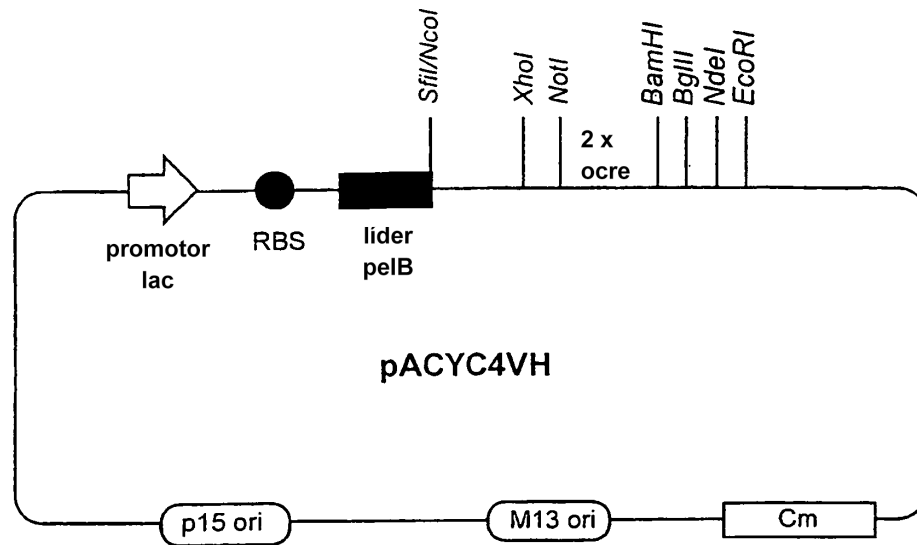


Figura 15

70



RBS

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATA ATG AAA TAC CTA
 -----> M K Y L

LMB3

SfiI NcoI

TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG TTT
 L P T A A A G L L L L A A Q P A M A E V F

XhoI NotI BamHI BglI

GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GCG GCC GCA TAA TAA GGA TCC AGA
 D Y W G Q G T L V T V S S A A A O O G S R

NdeI EcoRI

TCT CAT ATG GAA TTC
 S H M E F

Figura 16

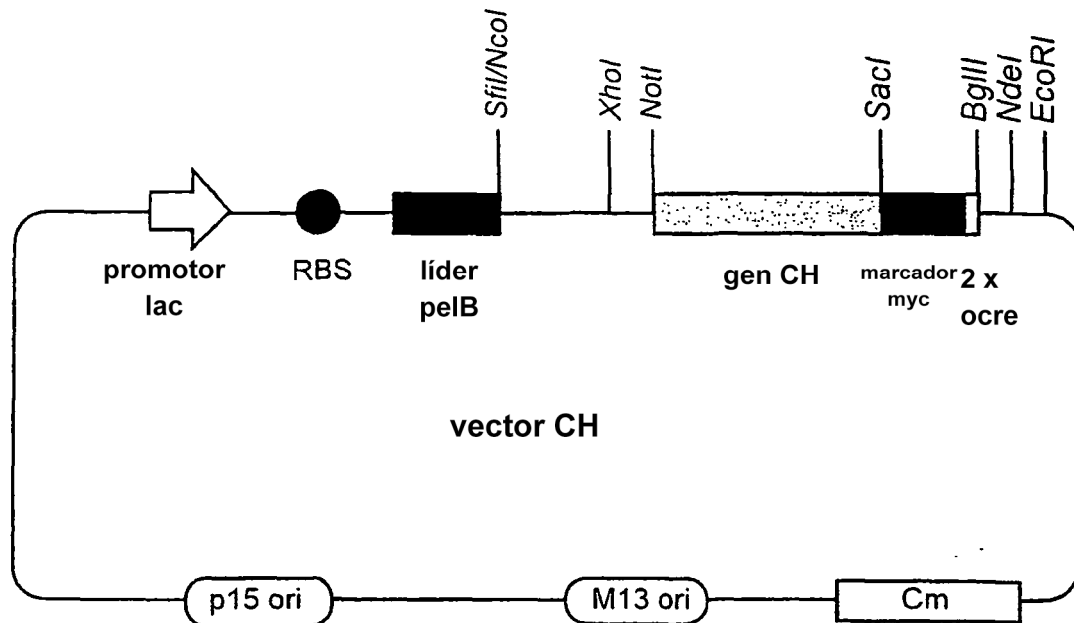


Figura 17

1,802
1,823
0,03

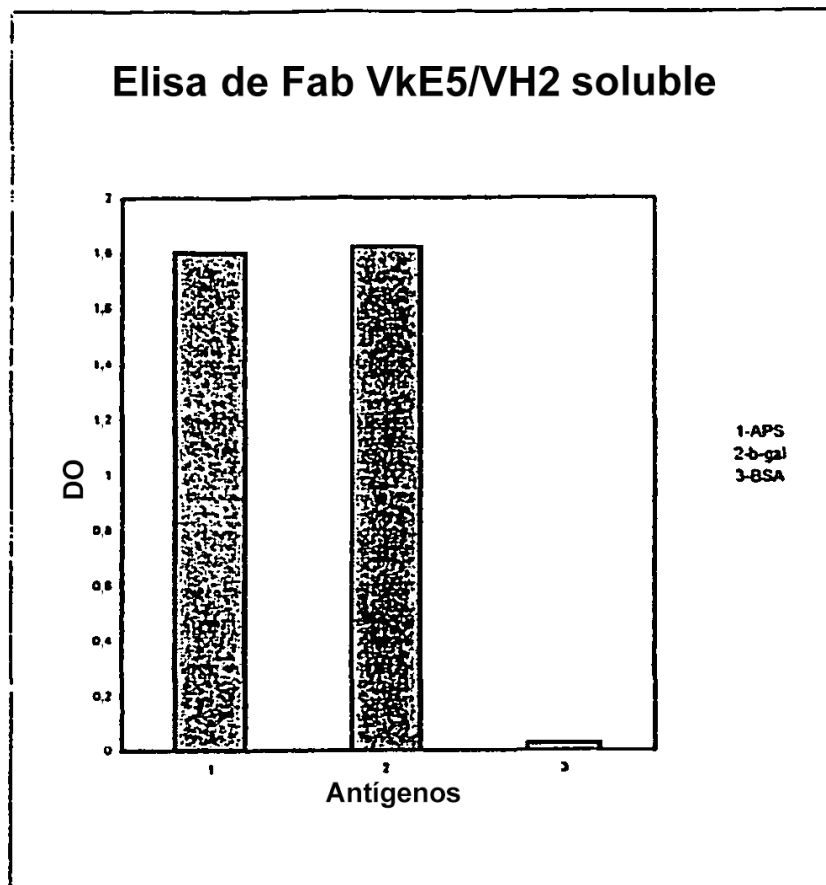
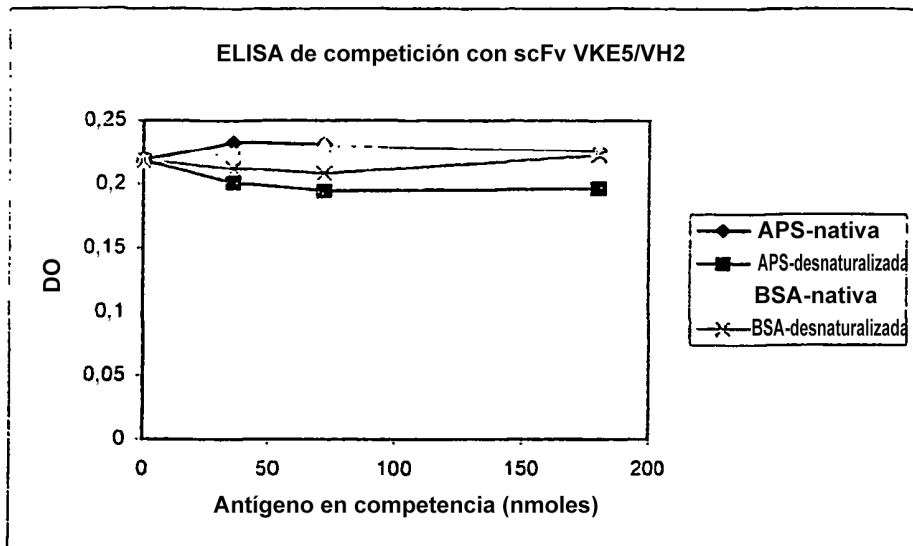


Figura 18

Conc. (nmoles)	APS-nativa	APS-desnaturalizada	BSA-nativa	BSA-desnaturalizada
0	0,218	0,218	0,218	0,218
36	0,233	0,201	0,224	0,212
72	0,231	0,194	0,231	0,208
180	0,226	0,196	0,227	0,222



Conc. (nmoles)	APS-nativa	APS-desnaturalizada	BSA-nativa	BSA-desnaturalizada
0	0,227	0,227	0,227	0,227
36	0,225	0,097	0,221	0,22
72	0,225	0,089	0,229	0,218
180	0,231	0,09	0,23	0,213

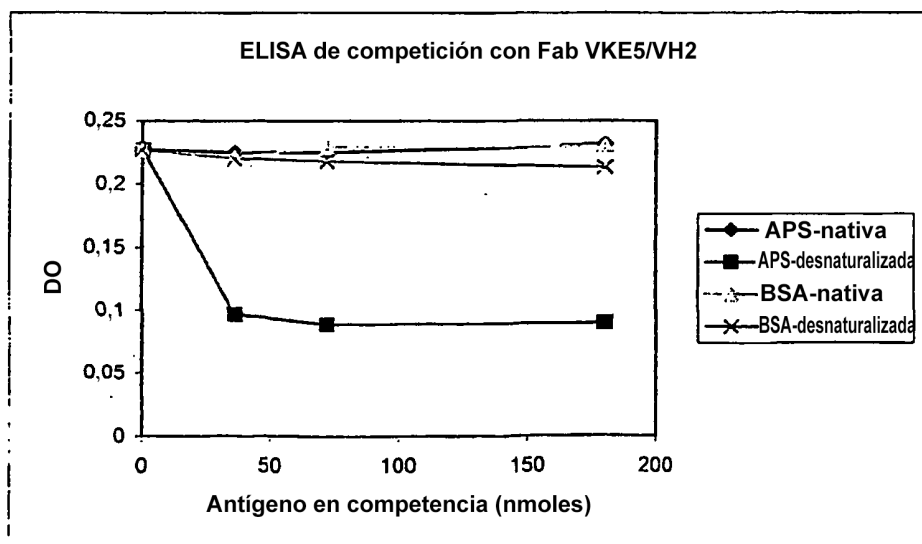


Figura 19