

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 094**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2018** **PCT/EP2018/064622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2018** **WO18224439**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2018** **E 18729642 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025** **EP 3634997**

54 Título: **Anticuerpos anti-HSA**

30 Prioridad:

05.06.2017 US 201762515293 P
10.10.2017 EP 17195783

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.04.2025

73 Titular/es:

NUMAB THERAPEUTICS AG (100.00%)
Bachtobelstrasse 5
8810 Horgen, CH

72 Inventor/es:

GUNDE, TEA;
MEYER, SEBASTIAN;
HESS, CHRISTIAN y
BIERI, TESSA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 3 015 094 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

Anticuerpos anti-HSA

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos que son específicos para albúmina sérica humana (HSA).

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a un nuevo anticuerpo con especificidad de unión para la albúmina sérica humana, que tiene propiedades ventajosas, tales como alta estabilidad, propensión a la agregación reducida, y afinidad de unión mejorada, y que es particularmente adecuado para la generación de constructos de anticuerpos multiespecíficos.

10 En los últimos cuarenta años desde el desarrollo de los primeros anticuerpos monoclonales ("AcM"; Köhler & Milstein, *Nature*, 256 (1975) 495-7), los anticuerpos se han convertido en una clase cada vez más importante de biomoléculas con fines de investigación, diagnóstico y terapéuticos. Inicialmente, los anticuerpos se obtenían exclusivamente inmunizando animales con el correspondiente antígeno de interés. Aunque los anticuerpos de origen no humano pueden usarse en investigación y diagnóstico, en los enfoques terapéuticos el cuerpo humano puede reconocer los anticuerpos no humanos como extraños y suscitar una respuesta inmunitaria contra la sustancia farmacológica del anticuerpo no humano, haciéndola menos eficaz o ineficaz. Por tanto, se han establecido métodos recombinantes para hacer que los anticuerpos no humanos sean menos inmunogénicos.

Con cualquier enfoque elegido, lo ideal es que el AcM o fragmento funcional resultante conserve las propiedades farmacodinámicas deseadas del AcM donante, al tiempo que presenta propiedades biofísicas similares a un fármaco y una inmunogenicidad mínima.

20 Con respecto a las propiedades biofísicas de los fragmentos funcionales de anticuerpos, la semivida más corta en plasma, en comparación con los anticuerpos IgG completos, ha sido una de las principales preocupaciones para la capacidad de desarrollo de moléculas terapéuticas.

25 En el pasado se han desarrollado varios enfoques para prolongar la semivida de los fragmentos de anticuerpos. Estos enfoques incluyen el uso de formulaciones específicas de liberación lenta (Mainardes y Silva, 2004), la reducción de la susceptibilidad de los fragmentos a las proteasas séricas (Werle y Bernkop-Schnürch, 2006), o la reducción de la tasa intrínseca de aclaramiento de los fragmentos de anticuerpos mediante sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del receptor en los compartimentos endosómicos intracelulares, lo que conduce de este modo a un reciclaje aumentado en el proceso de clasificación del ligando y da como resultado, por consiguiente, una semivida más larga en el medio extracelular (Sarkar *et al.*, 2002).

30 Además, la conjugación de una proteína terapéutica con una segunda molécula que tiene una semivida sérica inherentemente larga se ha realizado en diferentes entornos. Uno de tales métodos es aumentar el tamaño hidrodinámico de la proteína mediante la unión química de polietilenglicol (PEG) (Chapman, 2002; Pockros *et al.*, 2004; Veronese y Pasut, 2005), que puede producir un fármaco con una semivida terminal en seres humanos de hasta 14 días (Choy *et al.*, 2002), o con secuencias polipeptídicas conformacionalmente desordenadas compuestas por los aminoácidos Pro, Ala y/o Ser ("PASilación"; véase Binder & Skerra (2017) *Curr. Opin. Colloid Int.* 31 (2017) 10-17). Alternativamente, las proteínas terapéuticas se han producido como una fusión genética con una proteína natural que tiene una semivida sérica larga; o bien la albúmina sérica (SA) de 67 kDa (Syed *et al.*, 1997; Osborn *et al.*, 2002) o bien la porción Fc de un anticuerpo, que añade 60-70 kDa adicionales en su forma dimérica natural, dependiendo de la glucosilación (Mohler *et al.*, 1993). Esto produce fármacos que tienen semividas terminales en seres humanos de varios días (por ejemplo, 4 días para el receptor de TNF (p75) fusionado a una región Fc (Lee *et al.*, 2003)).

45 Holt *et al.* han ampliado el último enfoque usando anticuerpos de dominio contra la albúmina sérica para prolongar la semivida de fármacos de vida corta (Holt *et al.*, *Protein Engineering, Design and Selection* 21 (2008) 283-288). Pudo demostrarse que las fusiones de tal fármaco con un anticuerpo de dominio de VH contra la HSA dio como resultado una prolongación de la semivida sérica del antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra). Sin embargo, Holt *et al.* usaron exclusivamente anticuerpos de dominio único, limitando así el uso de tal tecnología para enfoques basados en la interacción de dominios de VL y VH complementarios como dominios de heteroasociación.

50 El documento WO 2010/035012 da a conocer anticuerpos de dominio único que se unen a la albúmina sérica humana y se usan en constructos multiespecíficos. Se muestran datos sobre reactividad cruzada, dependencia del pH y afinidades para HSA humana y de ratón.

El documento WO 2011/036460 da a conocer anticuerpos de dominio único que se unen a la albúmina sérica humana.

El documento WO 2013/068571 da a conocer anticuerpos de dominio único que se unen a la albúmina sérica humana y se usan en constructos multiespecíficos y de scFv. Se muestran datos sobre la reactividad cruzada, la

dependencia del pH, las afinidades para la HSA humana y de ratón, y las temperaturas de fusión.

El documento WO 2010/094722 da a conocer anticuerpos de dominio único que se unen a la albúmina sérica humana, así como a la albúmina sérica de rata y de mono, que se usan en constructos multiespecíficos con el fin de prolongar la semivida de los constructos.

- 5 Davé *et al.*, MABS 8 (2016), 1319-1335, dan a conocer constructos Fab-dsFv, en donde el dominio de Fv de un dominio humanizado de unión a albúmina se fusiona a los extremos C-terminales de los dominios de CH y CL de Fab, en donde el dominio de Fv se estabiliza además mediante un puente disulfuro interdominio.

Aunque el uso de un anticuerpo anti-HSA o un fragmento del mismo parecía ofrecer una opción interesante, cualquiera de tales anticuerpos tendría que presentar un patrón complejo de características con el fin de abordar con
10 éxito las cuestiones abiertas que plantea un enfoque de este tipo: (i) el anticuerpo anti-HSA o fragmento del mismo tendría que tener una alta afinidad por HSA; (ii) el anticuerpo anti-HSA o fragmento del mismo tendría que tener una alta afinidad a valores de pH de aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,4 con el fin de salvaguardar una unión estable en las condiciones fisiológicamente relevantes; (iii) el anticuerpo tiene que ser específico para HSA, pero ofrecer reactividad cruzada con la albúmina sérica de primates no humanos y/o de roedores, con el fin de permitir la
15 realización de pruebas preclínicas adecuadas de constructos que comprendan tal anticuerpo anti-HSA o fragmento del mismo; (iv) la unión del anticuerpo anti-HSA o fragmento del mismo a HSA tiene que mantener la capacidad de la HSA unida al anticuerpo de unirse a FcRn para permitir que el anticuerpo anti-HSA o fragmento del mismo se recicle con HSA a través de la interacción entre HSA y FcRn; (v) cuando se usa en un formato de fragmento de anticuerpo, el fragmento tiene que ser estable tal como lo demuestra una alta temperatura de fusión en el
20 desplegamiento térmico; y (vi) cuando se usa en un formato de fragmento de anticuerpo, el fragmento tiene que ser estable tal como lo demuestra la ausencia de, o una cantidad limitada de, productos de degradación y/o agregados en un estudio de estabilidad frente a estrés. Aunque es bien sabido por cualquier experto en la técnica que es posible obtener un anticuerpo que tenga un parámetro deseado, tal como la afinidad de un anticuerpo, por inmunización, por cribado o selección de bibliotecas y/o por optimización de tal parámetro de un anticuerpo parental,
25 con una expectativa razonable de éxito, es bastante impredecible si será posible o no obtener o generar un anticuerpo caracterizado por un patrón tan complejo de parámetros (i) a (vi).

Por tanto, a pesar de que ya se han realizado muchos intentos para abordar la cuestión del aumento de la semivida sérica de los constructos basados en fragmentos de anticuerpos, sigue existiendo una gran necesidad insatisfecha de desarrollar nuevos enfoques y/o constructos que puedan usarse en la construcción de constructos de anticuerpos multiespecíficos y que den lugar a una prolongación de la semivida de tales constructos.
30

La solución para este problema que se ha proporcionado por la presente invención, es decir, nuevos anticuerpos anti-HSA y fragmentos de los mismos, no se ha logrado o sugerido hasta ahora por la técnica anterior.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos que son específicos para albúmina sérica humana (HSA).

- 35 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es específico para albúmina sérica humana, que comprende (i) una cadena ligera variable con una secuencia según SEQ ID NO: 1, y una cadena pesada variable con una secuencia según SEQ ID NO: 2, o (ii) una cadena ligera variable con una secuencia según SEQ ID NO: 3, y una cadena pesada variable con una secuencia según SEQ ID NO: 4.

- 40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, y opcionalmente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 45 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico o a una colección de secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un vector o a una colección de vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico o la colección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención.

- 50 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que comprende la etapa de expresar la secuencia de ácido nucleico o la colección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención, o el vector o colección de vectores de la presente invención, o la célula huésped, en particular la célula huésped de expresión, de la presente invención.

- 55 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método para generar un constructo multiespecífico, que comprende la etapa de clonar, en una o más etapas, una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención, en un constructo multiespecífico que comprende al menos un segundo dominio bioactivo y, opcionalmente, uno o más dominios bioactivos

adicionales.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende (i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención; y (ii) un segundo dominio bioactivo; y, opcionalmente, (iii) uno o más dominios bioactivos adicionales.

- 5 En un octavo aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, o a un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para su uso como medicamento.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La figura 1 muestra los parámetros farmacodinámicos de PRO462 tras administración intravenosa (3 mg/ml) a macacos cangrejeros (3 por grupo, se muestra el promedio; véanse los datos en la tabla 8, ejemplo 7). Se tomaron muestras de sangre durante un periodo de 21 días. El gráfico muestra las concentraciones plasmáticas medias por grupo de PRO462. Los puntos temporales posteriores se omiten debido al desarrollo de anticuerpos contra el fármaco.

- 15 La figura 2 muestra los resultados del estudio PK en ratones comentado en el ejemplo 6 (concentraciones plasmáticas medias por grupo de PRO497 en ratones CD-1 macho dosificados por vía intravenosa con 5 mg/kg de artículo de ensayo; véanse los datos en la tabla 9).

La figura 3 muestra la estructura del constructo multiespecífico PRO497.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a nuevos anticuerpos que son específicos para albúmina sérica humana (HSA).

- 20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 25 A menos que se indique lo contrario, los términos “que comprende” e “que incluye” se emplean en el presente documento en sentido amplio y no limitativo. Con respecto a estas últimas realizaciones, el término “que comprende” incluye de este modo el término más restringido “que consiste en”.

- 30 Debe interpretarse que los términos “un/uno” y “una” y “el/la” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo sus mezclas. Cuando se use la forma plural para compuestos, sales y similares, se entenderá que también se refiere a un único compuesto, sal o similar.

- 35 El término “HSA” se refiere en particular a la albúmina sérica humana con número de identificación UniProt P02768, o a una variante de la misma. La albúmina sérica humana (HSA) es una proteína abundante de 66,4 kDa en el suero humano (el 50 % de la proteína total) compuesta por 585 aminoácidos (Sugio, Protein Eng, vol. 12, 1999, 439-446). La proteína HSA multifuncional está asociada a una estructura que permite unir y transportar una serie de metabolitos como ácidos grasos, iones metálicos, bilirrubina y algunos fármacos (Fanali, Molecular Aspects of Medicine, vol. 33, 2012, 209-290). La concentración de HSA en el suero es de aproximadamente de 3,5-5 g/dl. Los anticuerpos de unión a albúmina y fragmentos de los mismos pueden usarse, por ejemplo, para prolongar la semivida sérica *in vivo* de fármacos o proteínas conjugadas con los mismos.

- 40 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es específico para albúmina sérica humana, que comprende (i) una cadena ligera variable con una secuencia según SEQ ID NO: 1, y una cadena pesada variable con una secuencia según SEQ ID NO: 2, o (ii) una cadena ligera variable con una secuencia según SEQ ID NO: 3, y una cadena pesada variable con una secuencia según SEQ ID NO: 4.

- 45 Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es específico para albúmina sérica humana, que es una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende:

- 50 una cadena ligera variable, en donde la cadena ligera variable comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, las regiones LFW1-LCDR1-LFW2-LCDR2-LFW3-LCDR3-LFW4, en donde cada LFW designa una región de entramado de cadena ligera, y cada LCDR designa una región determinante de complementariedad de la cadena ligera, y en donde dichas LCDR juntas presentan al menos el 90 % de identidad de secuencia con las LCDR correspondientes tomadas de una secuencia de VL según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3;

y

una cadena pesada variable, en donde la cadena pesada variable comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, las regiones HFW1-HCDR1-HFW2-HCDR2-HFW3-HCDR3-HFW4, en donde cada HFW designa una región de entramado de cadena pesada, y cada HCDR designa una región determinante de complementariedad de la cadena pesada, y en donde dichas HCDR juntas presentan al menos el 90 % de identidad de secuencia con las HCDR correspondientes tomadas de una secuencia de VH según SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" se usa como sinónimo de "inmunoglobulina" (Ig), que se define como una proteína perteneciente a la clase IgG, IgM, IgE, IgA, IgY o IgD (o cualquier subclase de las mismas), e incluye todos los anticuerpos conocidos convencionalmente. Un "anticuerpo" que se produce de manera natural es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FW). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FW dispuestas de desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3-FW4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo intacto, o variantes recombinantes del mismo, y el término "fragmento funcional" o "fragmento de anticuerpo funcional" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende al menos un dominio de unión a antígeno, por ejemplo, una región variable determinante antigénica de un anticuerpo intacto, que es suficiente para conferir reconocimiento y unión específica del fragmento de anticuerpo funcional a una diana, tal como un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos funcionales incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único tales como sdAb (o bien VL o bien VH), dominios VHH de camélidos, y moléculas multispecíficas formadas a partir de fragmentos de anticuerpos tales como un fragmento bivalente que comprende dos o más, por ejemplo, dos, fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, o dos o más, por ejemplo, dos, CDR aisladas u otros fragmentos de unión a epítopos de un anticuerpo unido. Un fragmento de anticuerpo también puede incorporarse a anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de anticuerpos también pueden injertarse en andamiajes basados en polipéptidos tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente estadounidense n.º: 6.703.199, que describe minicuerpos de polipéptidos de fibronectina). Una "región de unión a antígeno" o "dominio de unión a antígeno" de un anticuerpo se encuentra típicamente en una o más regiones hipervariables de un anticuerpo, es decir, las regiones CDR1, CDR2, y/o CDR3; sin embargo, las regiones de "entramado" variables también pueden desempeñar un papel importante en la unión a antígeno, tal como mediante la provisión de un andamiaje para las CDR. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camélidos o anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Las "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR") son secuencias de aminoácidos cuyos límites se determinan usando cualquiera de los varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273, 927-948 (esquema de numeración "Chothia") y numeración ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003) (esquema de numeración "IMGT"). Por ejemplo, para los formatos clásicos, según Kabat, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de cadena pesada (VH) se numeran 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de cadena ligera (VL) se numeran 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3). Según Chothia, los aminoácidos de CDR en la VH se numeran 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos en la VL se numeran 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3). Combinando las definiciones de CDR de Kabat y Chothia, las CDR consisten en los residuos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2), y 95-102 (HCDR3) en la VH humana y los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2), y 89-97 (LCDR3) en la VL humana. Según IMGT, los residuos de aminoácidos de CDR en la VH se numeran aproximadamente 26-35 (HCDR1), 51-57 (HCDR2) y 93-102 (HCDR3), y los residuos de aminoácidos de CDR en la VL se numeran aproximadamente 27-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) (numeración según "Kabat"). Según IMGT, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse usando el programa IMGT/DomainGap Align.

En el contexto de la presente invención, se usa el sistema de numeración sugerido por Honegger & Plückthun ("numeración AHO") (Honegger & Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 657-670), a menos que se mencione específicamente lo contrario. Además, se definen como CDR los siguientes residuos: LCDR1 (también denominada

CDR-L1): L24-L42; LCDR2 (también denominada CDR-L2): L58-L72; LCDR3 (también denominada CDR-L3): L107-L138; HCDR1 (también denominado CDR-H1): H27-H42; HCDR2 (también denominada CDR-H2): H57-H76; HCDR3 (también denominada CDR-H3): H108-H138.

Preferiblemente, la "región de unión a antígeno" comprende al menos los residuos de aminoácidos 4 a 138 de la cadena ligera variable (VL) y 5 a 138 de la cadena pesada variable (VH) (en cada caso numeración según Honegger & Plückthun), más preferiblemente los residuos de aminoácidos 3 a 144 de VL y 4 a 144 de VH, y particularmente preferidas son las cadenas VL y VH completas (posiciones de aminoácidos 1 a 149 de VL y 1 a 149 de VH). Las regiones de entramado y CDR se indican en la tabla 7. Una clase preferida de inmunoglobulinas para su uso en la presente invención es la IgG. Los "fragmentos funcionales" de la invención incluyen el dominio de un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab, Fv y scFv. El F(ab')₂ o Fab puede modificarse por ingeniería para minimizar o eliminar completamente las interacciones disulfuro intermoleculares que se producen entre los dominios CH1 y CL. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención pueden formar parte de constructos bifuncionales o multifuncionales, tal como se describe adicionalmente en las secciones a [0081] a [0087].

Tal como se usa en el presente documento, una molécula de unión es "específica a/para", "reconoce específicamente" o "se une específicamente a" una diana, tal como por ejemplo la albúmina sérica humana, cuando tal molécula de unión puede discriminar entre tal biomolécula diana y una o más moléculas de referencia, ya que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino relativa. En su forma más general (y cuando no se menciona ninguna referencia definida), "unión específica" se refiere a la capacidad de la molécula de unión para discriminar entre la biomolécula diana de interés y una biomolécula no relacionada, tal como se determina, por ejemplo, según métodos de ensayo de especificidad conocidos en la técnica. Tales métodos comprenden, pero no se limitan a, inmunotransferencias de tipo Western, ELISA, RIA, ECL, IRMA, ensayos SPR (resonancia de plasmón superficial) y exploraciones peptídicas. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo ELISA convencional. La puntuación puede realizarse mediante el desarrollo de color convencional (por ejemplo, anticuerpo secundario con peróxido de rábano picante y tetrametilbencidina con peróxido de hidrógeno). La reacción en determinados pocillos se puntúa mediante la densidad óptica, por ejemplo, a 450 nm. El fondo típico (= reacción negativa) puede ser de aproximadamente 0,1 DO; la reacción positiva típica puede ser de aproximadamente 1 DO. Esto significa que la razón entre una puntuación positiva y una negativa puede ser de 10 veces o más. En un ejemplo adicional, puede llevarse a cabo un ensayo SPR, en donde una diferencia de al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, entre el fondo y la señal indica una unión específica. Típicamente, la determinación de la especificidad de unión se realiza usando no una única biomolécula de referencia, sino un conjunto de unas tres a cinco biomoléculas no relacionadas, tales como leche en polvo, transferrina o similares.

Sin embargo, "unión específica" también puede referirse a la capacidad de una molécula de unión para discriminar entre la biomolécula diana y una o más biomoléculas estrechamente relacionadas, que se usan como puntos de referencia, tal como, por ejemplo, las albúminas séricas de una especie diferente, por ejemplo, la albúmina sérica bovina. Además, la "unión específica" puede referirse a la capacidad de una molécula de unión para discriminar entre diferentes partes de su antígeno diana, por ejemplo, diferentes dominios, regiones o epítopos de la biomolécula diana, o entre uno o más residuos de aminoácidos clave o tramos de residuos de aminoácidos de la biomolécula diana.

En el contexto de la presente invención, el término "epítipo" se refiere a la parte de una biomolécula diana dada que se requiere para la unión específica entre la biomolécula diana y una molécula de unión. Un epítipo puede ser continuo, es decir, formado por elementos estructurales adyacentes presentes en la biomolécula diana, o discontinuo, es decir, formado por elementos estructurales que se encuentran en posiciones diferentes en la secuencia primaria de la biomolécula diana, tal como en la secuencia de aminoácidos de una proteína como diana, pero en estrecha proximidad en la estructura tridimensional, que adopta la biomolécula diana, tal como en el líquido corporal.

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en donde dicha cadena ligera variable es una cadena ligera V_κ1, y/o dicha cadena pesada variable es una cadena VH3. Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en donde dicha cadena ligera variable es una cadena ligera quimérica, que comprende las regiones de entramado I a III de V_κ y una región de entramado IV de V_λ. Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en donde dicha cadena ligera es una cadena ligera quimérica, que comprende:

- (i) dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de una secuencia de VL según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3;
- (ii) regiones de entramado FW1 a FW3 de V_κ humana, en particular las regiones de entramado FW1 a FW3 de V_κ1 humana;
- (iii) FW4, que se selecciona de (a) una secuencia de línea germinal de V_λ humana para FW4, particularmente una secuencia de línea germinal de V_λ seleccionada de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, preferiblemente SEQ ID NO:

7; y (b) una secuencia basada en $V\lambda$, que tiene una o dos mutaciones, particularmente una mutación, en comparación con la secuencia de línea germinal de $V\lambda$ humana más cercana para FW4 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, preferiblemente SEQ ID NO: 7.

En el contexto de la presente invención, los términos "VH" (cadena pesada variable), " $V\kappa$ " y " $V\lambda$ " se refieren a familias de secuencias de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos que se agrupan según la identidad y homología de secuencias. Los métodos para la determinación de homologías de secuencia, por ejemplo, usando una matriz de búsqueda de homología como BLOSUM (Henikoff, S. & Henikoff, J. G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 10915-10919), y los métodos para la agrupación de secuencias según homologías son bien conocidos por el experto habitual en la técnica. Para VH, $V\kappa$ y $V\lambda$ pueden identificarse diferentes subfamilias, tal como se muestra, por ejemplo, en Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86, que agrupa VH en VH1A, VH1B y VH2 a VH6, $V\kappa$ en $V\kappa 1$ a $V\kappa 4$ y $V\lambda$ en $V\lambda 1$ a $V\lambda 3$. *In vivo*, las cadenas $V\kappa$, $V\lambda$ y VH de los anticuerpos son el resultado de la reordenación aleatoria de los segmentos V y J de la cadena κ de la línea germinal, de los segmentos V y J de la cadena λ de la línea germinal, y de los segmentos V, D y J de la cadena pesada, respectivamente. La subfamilia a la que pertenece una cadena variable de anticuerpo viene determinada por el segmento V correspondiente y, en particular, por las regiones de entramado FW1 a FW3. Por tanto, cualquier secuencia de VH que se caracterice en la presente solicitud por un conjunto particular de regiones de entramado HFW1 a HFW3 únicamente, puede combinarse con cualquier secuencia HFW4, por ejemplo, una secuencia HFW4 tomada de uno de los segmentos J de la línea germinal de la cadena pesada, o una secuencia HFW4 tomada de una secuencia de VH reordenada. En determinadas realizaciones, la secuencia HFW4 es WGQGTSLTVSS.

Convenientemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo. El término "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, significa un polipéptido o una proteína del mismo que, en virtud de su origen o manipulación: (i) está presente en una célula huésped como producto de expresión de una porción de un vector de expresión, o (ii) está unido a una proteína u otro resto químico distinto de aquel al que está unido en la naturaleza, o (iii) no se encuentra en la naturaleza. Por "aislado" se entiende además una proteína que: (i) se sintetiza químicamente; o (ii) se expresa en una célula huésped y se purifica separándola de las proteínas asociadas, por ejemplo, mediante cromatografía en gel. El término "anticuerpo aislado" también se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la albúmina sérica humana está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de la albúmina sérica humana). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la albúmina sérica humana puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de albúmina sérica de otras especies (por ejemplo, albúmina sérica de primates no humanos y/o roedores). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma de las interacciones no covalentes totales entre un único sitio de unión o una molécula, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y su par de unión, por ejemplo, un antígeno. A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja la interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión, por ejemplo, la interacción de un único dominio de unión de anticuerpo y su antígeno. La afinidad puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento, en particular la afinidad puede medirse mediante resonancia de plasmón superficial. En una realización particular, el anticuerpo de la invención o el fragmento n puede tener una K_D de entre 1 y 50.000 pM, 1 y 40.000 pM, 1 y 30.000 pM, 1 y 25.000 pM, 1 y 20.000 pM, 1 y 10.000 pM, 1 y 7.500 pM, 1 y 5.000 pM, 1 y 4.000 pM, 1 y 3.000 pM, 1 y 2.000 pM, 1 y 1.500 pM, 1 y 1.000 pM, preferiblemente tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; más concretamente, tal como se determina mediante el método mostrado en el ejemplo 2.1. En una realización particular, el anticuerpo de la invención o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un valor de K_D para la unión a albúmina sérica humana de menos de 50 nM, particularmente menos de 3 nM, más particularmente menos de 1 nM, preferiblemente tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; más particularmente tal como se determina mediante el método mostrado en el ejemplo 2.1. En una realización adicional, el anticuerpo de la invención o el fragmento de unión a antígeno tiene dicho valor de K_D para la unión a albúmina sérica humana a valores de pH tanto de aproximadamente 5,5 como de aproximadamente 7,4. En una realización particular, el anticuerpo de la invención o el fragmento de unión a antígeno puede tener un valor de K_D para la unión a albúmina sérica de primate no humano y/o roedor de entre 1 y 250.000 pM, 1 y 200.000 pM, 1 y 150.000 pM, 1 y 100.000 pM, 1 y 75.000 pM, 1 y 50.000 pM, 1 y 40.000 pM, 1 y 30.000 pM, 1 y 20.000 pM, 1 y 10.000 pM, 1 y 7.500 pM, 1 y 5.000 pM, preferiblemente tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; más particularmente, tal como se determina mediante el método mostrado en el ejemplo 2.1. En una realización particular, el anticuerpo de la invención o el fragmento de unión a antígeno tiene un valor de K_D para la unión a albúmina sérica de primate no humano y/o roedor de menos de 250 nM, particularmente menos de 100 nM, más particularmente menos de 50 nM, en particular tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; más particularmente tal como se determina mediante el método mostrado en el ejemplo 2.1.

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de

unión a antígeno del mismo de la presente invención, en donde dicha cadena ligera variable presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con una secuencia de VL según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, y/o en donde dicha cadena pesada variable es una cadena VH3 que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con una secuencia de VH según SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias polipeptídicas o de aminoácidos: "identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad de secuencia", y "similitud de secuencia" o "porcentaje de similitud de secuencia". El término "identidad de secuencia", tal como se usa en el presente documento, se determina calculando el número máximo de residuos de aminoácidos que son idénticos entre dos secuencias polipeptídicas, en donde los huecos y/o inserciones pueden factorizarse para permitir el mayor grado de solapamiento de secuencias. Por ejemplo, dos polipéptidos de 100 meros que son totalmente idénticos tienen una identidad de secuencia del 100 %. Cuando difieren en una única mutación, o cuando uno de los polipéptidos contiene una delección de un aminoácido, la identidad de secuencia es del 99% (99 de cada 100 posiciones son idénticas). En otras palabras, el "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la misma base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o residuo de aminoácido en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. La "similitud de secuencia" es el grado de parecido entre dos secuencias cuando se comparan. Cuando sea necesario o se desee, la alineación óptima de las secuencias para su comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)), mediante el algoritmo de alineación homológica de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443-53 (1970)), mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-48 (1988)), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual. (Véase en general Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1999)). A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el grado de similitud de secuencias al que se hace referencia en el presente documento se determina mediante la utilización de la matriz PAM de Dayhoff (M.O. Dayhoff, R. Schwartz, B.C. Orcutt: A model of Evolutionary Change in Proteins, páginas 345-352; en: Atlas of protein sequence and structure, National Biomedical Research Foundation, 1979).

El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos que se producen de manera natural y sintéticos, así como a los análogos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera asimilar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos modificados posteriormente, por ejemplo, la hidroxiprolina, el gamma-carboxiglutamato, y la O-fosfoserina. Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido que se produce de manera natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural y a polímeros de aminoácidos que se producen de manera no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma.

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (i) una cadena ligera variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VL según SEQ ID NO: 1, y una cadena VH que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VH según SEQ ID NO: 2, o (ii) una cadena ligera variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VL según SEQ ID NO: 3, y una cadena VH que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VH según SEQ ID NO: 4.

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que es específico para albúmina sérica humana, que comprende: (i) una cadena ligera variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VL según SEQ ID NO: 1, en donde dicha cadena ligera variable comprende los dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de una secuencia de VL según SEQ ID NO: 1; y (ii) una cadena pesada variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VH según SEQ ID NO: 2,

en donde dicha cadena pesada variable comprende los dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de una secuencia de VH según SEQ ID NO: 2. Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que es específico para albúmina sérica humana, que comprende: (i) una cadena ligera variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VL según SEQ ID NO: 1, en donde dicha cadena ligera variable comprende dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de una secuencia de VL según SEQ ID NO: 1, y en donde dicha cadena ligera variable comprende K50Q y A51P (numeración AHO); y (ii) una cadena pesada variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VH según SEQ ID NO: 2, en donde dicha cadena pesada variable comprende los dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de la secuencia de VH según SEQ ID NO: 2, y en donde dicha cadena pesada variable comprende W54Y, V103T e Y105F (numeración AHO).

Se describe además, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que es específico para albúmina sérica humana, que comprende (i) una cadena ligera variable que comprende una variante modificada de manera conservadora de la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, y (ii) una cadena pesada variable que comprende una variante modificada de manera conservadora de la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2.

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que es específico para albúmina sérica humana, que comprende: (i) una cadena ligera variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VL según SEQ ID NO: 3, en donde dicha cadena ligera variable comprende los dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de la secuencia de VL según SEQ ID NO: 3; y (ii) una cadena pesada variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VH según SEQ ID NO: 4, en donde dicha cadena pesada variable comprende los dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de la secuencia de VH según SEQ ID NO: 4. Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que es específico para albúmina sérica humana, que comprende: (i) una cadena ligera variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VL según SEQ ID NO: 3, en donde dicha cadena ligera variable comprende dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de la secuencia de VL según SEQ ID NO: 3, y en donde dicha cadena ligera variable comprende I2V, Q3V, K50Q y A51P (numeración AHO); y (ii) una cadena pesada variable que presenta al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento, preferiblemente al menos el 90 por ciento, de identidad de secuencia con la secuencia de VH según SEQ ID NO: 4, en donde dicha cadena pesada variable comprende los dominios de CDR CDR1, CDR2 y CDR3 tomados de la secuencia de VH según SEQ ID NO: 4, y en donde dicha cadena pesada variable comprende I55V, V103T, Y105F (numeración AHO).

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una variante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que es específico para albúmina sérica humana, que comprende (i) una cadena ligera variable que comprende una variante modificada de manera conservadora de la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 3, y (ii) una cadena pesada variable que comprende una variante modificada de manera conservadora de la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 4.

El término “variante modificada de manera conservadora” o “variantes conservadoras” se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica para una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la redundancia del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican para cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos para el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico del presente documento que codifica para un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias polipeptídicas, las “variantes modificadas de manera conservadora” o “variantes conservadoras” incluyen sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia polipeptídica, que dan lugar a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que

- proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora se suman a y no excluyen variantes polimórficas, homólogas interespecies, y alelos de la invención. Los ocho grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véanse, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)). En una realización, el término "modificaciones de secuencia conservadoras" se usa para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.
- 10 En una realización particular, el anticuerpo de la invención o el fragmento de unión a antígeno del mismo se caracteriza por uno o más de los siguientes parámetros:
- (i) tiene un valor de K_D para la unión a la albúmina sérica humana de menos de 50 nM, particularmente de menos de 3 nM, más particularmente de menos de 1 nM, en particular tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; más particularmente tal como se determina mediante el método mostrado en el ejemplo 2.1;
- 15 (ii) tiene tal valor de K_D para la unión a la albúmina sérica humana a valores de pH tanto de aproximadamente 5,5 como de aproximadamente 7,4, en particular tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial;
- (iii) tiene un valor de K_D para la unión a albúmina sérica de primates no humanos y/o roedores de menos de 250 nM, particularmente de menos de 100 nM, más particularmente de menos de 50 nM, en particular tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial; más particularmente tal como se determina mediante el método
- 20 mostrado en el ejemplo 2.1;
- (iv) la unión del anticuerpo anti-HSA o fragmento del mismo a HSA tiene que mantener la capacidad de la HSA unida al anticuerpo de unirse a FcRn para permitir que el anticuerpo anti-HSA o fragmento del mismo se recicle con la HSA a través de la interacción entre HSA y FcRn, tal como se determina mediante el ensayo usado en el ejemplo 2.2;
- 25 (v) tiene un punto medio promedio de temperatura de desplegamiento térmico (T_m) que supera al menos a 60 °C, cuando se expresa en el formato de anticuerpo scDb (formato de diacuerpo de cadena sencilla) o scFv (formato de fragmento variable de cadena sencilla), preferiblemente cuando se expresa en el formato de scFv, en particular tal como se determina mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF) tal como se describió anteriormente (Egan, *et al.*, *MAbs*, 9(1) (2017), 68-84; Niesen, *et al.*, *Nature Protocols*, 2(9) (2007) 2212-2221), en particular cuando las
- 30 muestras se diluyen en cinco tampones fosfato-citrato a valores de pH que oscilan entre 3,5 y 7,5 y que contienen NaCl 0,15-0,25 M, particularmente NaCl 0,15 M. El punto medio de transición para el desplegamiento térmico de los constructos de scFv se determina mediante fluorimetría diferencial de barrido usando el colorante de fluorescencia SYPRO® Orange (véase Wong & Raleigh, *Protein Science* 25 (2016) 1834-1840). Las muestras en condiciones de
- 35 excipiente relevantes se preparan a una concentración final de proteína de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ mediante las adiciones conocidas en excipientes madre que se preparan en tampón relevante. Para un experimento de exploración de tampones, las muestras se diluyen en tampones finales de scFv con diferentes valores de pH (pH 3,4, 4,4, 5,4, 6,4 y 7,2) que contienen una concentración final de 5x SYPRO® Orange en un volumen total de 100 μl . Junto con las muestras desconocidas se mide la referencia de DSF de scFv como control interno. Se añaden veinticinco microlitros de muestras preparadas por triplicado a placas de PCR de genes AB de paredes blancas. El ensayo se
- 40 realiza en una máquina de qPCR usada como termociclador, y la emisión de fluorescencia se detecta usando la rutina de calibración de colorantes personalizada del software. La placa de PCR que contiene las muestras de prueba se somete a una rampa de temperatura de desde 25 °C hasta 96 °C en incrementos de 1 °C con pausas de 30 s después de cada incremento de temperatura. El tiempo total del ensayo es de aproximadamente dos horas. La T_m se calcula mediante el software GraphPad Prism usando un método matemático de segunda derivada para
- 45 calcular el punto de inflexión de la curva; la T_m notificada es un promedio de tres mediciones; en una realización particular, la determinación de la T_m se realiza tal como se describe en el ejemplo 4.1, en donde una muestra se diluye en tampón fosfato-citrato a un valor de pH de 6,4, que contiene NaCl 0,25 M; y
- (vi) cuando se usa en un formato de fragmento de anticuerpo, el fragmento tiene que ser estable, tal como lo demuestra la ausencia de, o una cantidad limitada de, productos de degradación y/o agregados, tal como lo
- 50 demuestra una pérdida de menos del 3 % del contenido monomérico a 37 °C durante 28 días en un estudio de estabilidad frente a estrés, en particular realizado según el ejemplo 4.2, particularmente una pérdida de menos del 2 % del contenido monomérico, en particular cuando el anticuerpo de la invención está a una concentración inicial de 10 mg/ml.
- En una realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un punto medio
- 55 promedio de temperatura de desplegamiento térmico (T_m) que supera al menos 65 °C, preferiblemente al menos 69 °C. La proteína se analiza a lo largo de 14 días de almacenamiento a 37 °C en citrato-fosfato 50 mM pH 6,4, NaCl 150 mM con respecto a la oligomerización mediante SE-HPLC. Antes del estudio, las muestras se concentran hasta 10 g/l y se determinan los puntos tiempo d0. El contenido en monómeros se cuantifica mediante la separación de las muestras en una columna Shodex KW-402.5-4F y la evaluación de los cromatogramas resultantes. Para el cálculo

del porcentaje relativo de monómero proteico se divide el área del pico monomérico entre el área total de los picos que no pueden atribuirse a la matriz de la muestra. En una realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo presenta una pérdida de contenido monomérico de menos del 15 %, del 12 %, del 10 %, del 7 %, del 5 % o del 2 % cuando se almacena durante dos semanas a una concentración de 10 g/l a 37 °C en citrato-fosfato 50 mM pH 6,4, NaCl 150 mM, preferiblemente de menos del 5 %, más preferiblemente de menos del 2 %.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona de: un anticuerpo IgG, un fragmento Fab y un fragmento scFv. De manera adecuada, el anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo es un fragmento de anticuerpo scFv. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" o "sFv" comprenden los dominios de VH y VL de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios de VH y VL que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión a la diana. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios de VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, los polipéptidos scFv comprenden además un ligador polipeptídico entre los dominios de VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno (véase, por ejemplo, Plückthun, *The pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, 1994, págs. 269-315).

En realizaciones particulares, dicho fragmento de unión a antígeno es un formato de scFv que comprende el ligador según SEQ ID NO: 5.

En otra realización particular de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo es un constructo multiespecífico, por ejemplo, constructo biespecífico, o un constructo multivalente, por ejemplo, constructo bivalente, que es un formato de anticuerpo seleccionado de cualquier formato multiespecífico, por ejemplo, biespecífico, conocido en la técnica, incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, formatos basados en un diacuerpo de cadena sencilla (scDb), un scDb en tándem (Tandab), un scDb dimérico lineal (LD-scDb), un scDb dimérico circular (CD-scDb), un captador de células T biespecífico (BiTE; di-scFv en tándem), un tri-scFv en tándem, un tri-cuerpo (Fab-(scFv)₂) o bicuerpo (Fab-(scFv)₁), triacuerpo, scDb-scFv, Fab2 biespecífico, di-minianticuerpo, tetracuerpo, fusión scFv-Fc-scFv, di-diacuerpo, DVD-Ig, COVD, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, fusiones IgG-scFv, tal como bsAb (scFv unido al extremo C-terminal de la cadena ligera), Bs1Ab (scFv unido al extremo N-terminal de la cadena ligera), Bs2Ab (scFv unido al extremo N-terminal de la cadena pesada), Bs3Ab (scFv unido al extremo C-terminal de la cadena pesada), Ts1Ab (scFv unido al extremo N-terminal tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera), Ts2Ab (dsscFv unido al extremo C-terminal de la cadena pesada), y anticuerpos Knob-into-Hole (KiHs) (IgGs biespecíficos preparados mediante la tecnología KiH), un MATCH (descrito en el documento WO2016/0202457; Egan T., *et al.*, mAbs 9 (2017) 68-84) y DuoBodies (IgG biespecíficos preparados mediante la tecnología Duobody) (MAbs. feb/mar de 2017;9(2):182-212. doi: 10.1080/19420862.2016.1268307). Particularmente adecuado para su uso en el presente documento es un diacuerpo de cadena sencilla (scDb), en particular un scDb monomérico biespecífico. Más particularmente adecuado para su uso en el presente documento es un scDb-scFv o MATCH, preferiblemente scDb-scFv.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígenos, fragmentos que comprenden una VH conectado a una VL en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un ligador demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena para crear dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, los documentos EP404097, WO1993/01161, Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003), y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

El scDb biespecífico, en particular el scDb monomérico biespecífico, comprende en particular dos dominios de cadena pesada variable (VH) o fragmentos de los mismos y dos dominios de cadena ligera variable (VL) o fragmentos de los mismos conectados por ligadores L1, L2 y L3 en el orden VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA, VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA, VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA, VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA, VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB, VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB, VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB o VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB, en donde los dominios VLA y VHA forman conjuntamente el sitio de unión al antígeno para el primer antígeno, y VLB y VHB forman conjuntamente el sitio de unión al antígeno para el segundo antígeno.

El ligador L1 es particularmente un péptido de 2-10 aminoácidos, más particularmente de 3-7 aminoácidos, y lo más particularmente de 5 aminoácidos, y el ligador L3 es particularmente un péptido de 1-10 aminoácidos, más particularmente de 2-7 aminoácidos, y lo más particularmente de 5 aminoácidos. El ligador intermedio L2 es particularmente un péptido de 10-40 aminoácidos, más particularmente de 15-30 aminoácidos, y lo más particularmente de 20-25 aminoácidos.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo multiespecífico y/o multivalente en un formato MATCH descrito en el documento WO2016/0202457; Egan

T., *et al.*, mAbs 9 (2017) 68-84.

Los constructos biespecíficos, bivalentes, multiespecíficos y/o multivalentes de la presente invención pueden producirse usando cualquier método conveniente de fabricación de anticuerpos conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Fischer, N. & Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14 con respecto a la producción de constructos biespecíficos; Hornig, N. & Färber-Schwarz, A., Methods Mol. Biol. 907 (2012) 713-727, y el documento WO 99/57150 con respecto a diacuerpos biespecíficos y scFv en tándem). Los ejemplos específicos de métodos adecuados para la preparación del constructo biespecífico de la presente invención incluyen además, entre otros, la tecnología de Genmab (véase Labrijn *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (2013) 5145-5150) y la tecnología de Merus (véase de Kruif *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 106 (2010) 741-750). Los métodos para la producción de anticuerpos biespecíficos que comprenden una parte Fc de anticuerpo de unión a antígeno también son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Zhu *et al.*, Cancer Lett. 86 (1994) 127-134; y Suresh *et al.*, Methods Enzymol. 121 (1986) 210-228).

Estos métodos típicamente implican la generación de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, mediante la fusión de células de mieloma con las células del bazo de un ratón que se ha inmunizado con el antígeno deseado usando la tecnología del hibridoma (véase, por ejemplo, Yokoyama *et al.*, Curr. Protoc. Immunol. Capítulo 2, unidad 2.5, 2006) o mediante ingeniería de anticuerpos recombinantes (clonación de repertorios o presentación en fagos/levaduras) (véase, por ejemplo, Chames & Baty, FEMS Microbiol. Letters 189 (2000) 1-8), y la combinación de los dominios de unión a antígeno o fragmentos o partes de los mismos de dos anticuerpos monoclonales diferentes para obtener un constructo biespecífico mediante técnicas de clonación molecular conocidas.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, y opcionalmente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos o animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Las composiciones farmacéuticas según la presente divulgación pueden contener además, de manera rutinaria, concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponadores, conservantes, agentes potenciadores inmunitarios suplementarios tales como adyuvantes y citocinas y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. La composición también puede incluir antioxidantes y/o conservantes. Como antioxidantes pueden mencionarse derivados de tiol (por ejemplo, tioglicerol, cisteína, acetilcisteína, cistina, ditioeritritol, ditiotritol, glutatión), tocoferoles, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, sales de ácidos sulfurosos (por ejemplo, sulfato de sodio, bisulfato de sodio, bisulfato de sodio y acetona, metabisulfato de sodio, sulfato de sodio, sulfoxilato de formaldehído de sodio, tiosulfato de sodio) y ácido nordihidroguaiarético. Los conservantes adecuados pueden ser, por ejemplo, fenol, clorobutanol, bencilalcohol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de cetilpiridinio.

En realizaciones particulares proporcionadas en el presente documento, dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden aislarse, prepararse, expresarse, o crearse mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos recombinantes combinatoria, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique la creación, por ejemplo, mediante síntesis, ingeniería genética de secuencias de ADN que codifican para secuencias de inmunoglobulinas humanas, o corte y empalme de secuencias que codifican para inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, secuencias genéticas de inmunoglobulinas humanas, con otras de tales secuencias.

Por tanto, en un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico o una colección de secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

El término "ácido nucleico" se usa en el presente documento de manera intercambiable con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma o bien monocatenaria o bien bicatenaria. El término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de la cadena principal modificados, que son sintéticos, que se producen de manera natural, y que se producen de manera no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosforatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA). A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones redundantes de codones) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, tal como se detalla a continuación, las sustituciones redundantes de codones pueden conseguirse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones

seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; y Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un vector o una colección de vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico o una colección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención. El término "vector" o "vector de expresión" significa un polinucleótido, más habitualmente un plásmido de ADN, que comprende secuencias de nucleótidos que codifican para los anticuerpos de la invención o un fragmento de los mismos para la expresión recombinante en células huésped, preferiblemente en células de mamífero. Un vector puede replicarse en una célula o no. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica para la cadena pesada variable y/o la cadena ligera variable de un anticuerpo o un fragmento del mismo descrito en el presente documento, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, en el presente documento se describen métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica para anticuerpos. Pueden usarse métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican para anticuerpos y señales de control de la transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación genética *in vivo*.

Un vector de expresión puede transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células resultantes pueden cultivarse entonces mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo descrito en el presente documento o un fragmento del mismo. Por tanto, la presente descripción se refiere a una célula huésped, particularmente a una célula huésped de expresión, que comprende la secuencia de ácido nucleico o la colección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención, o el vector o colección de vectores de la presente invención. Se describe además una célula huésped que contiene un vector que comprende un polinucleótido que codifica tanto para la cadena pesada variable como para la cadena ligera variable del anticuerpo de la invención, o un fragmento del mismo. Se describe además una célula huésped que contiene dos vectores diferentes, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica para una cadena pesada variable de dicho anticuerpo, o un fragmento del mismo, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica para una cadena ligera variable de dicho anticuerpo, o un fragmento del mismo. Se describe además una primera célula huésped que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica para una cadena pesada variable de dicho anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y una segunda célula huésped que comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica para una cadena ligera variable de dicho anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los métodos para la humanización de anticuerpos de conejo o de roedor son bien conocidos por cualquier experto habitual en la técnica (véanse, por ejemplo, Borrás, loc. cit.; Rader *et al.*, The FASEB Journal, artículo expreso 10.1096/fj.02-0281fje, publicado en línea el 18 de octubre de 2002; Yu *et al.* (2010) A Humanized Anti-VEGF Rabbit Monoclonal Antibody Inhibits Angiogenesis and Blocks Tumor Growth in Xenograft Models. PLoS ONE 5(2): e9072. doi:10.1371/journal.pone.0009072). La inmunización de los conejos o roedores puede realizarse con el antígeno de interés como tal, como una proteína, o, en el caso de antígenos peptídicos o proteicos, mediante inmunización por ADN de un conejo con un ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido, que codifica para los péptidos o proteínas de interés.

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, una célula huésped, particularmente una célula huésped de expresión, que comprende la secuencia de ácido nucleico o la colección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención, o el vector o colección de vectores de la presente invención.

El término "célula huésped" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Debe entenderse que se pretende que tales términos se refieran no sólo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de tal célula. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido o bien a mutaciones o bien a influencias medioambientales, es posible que tal progenie no sea idéntica a la célula progenitora, pero todavía se incluye en el ámbito del término "célula huésped" tal como se usa en el presente documento.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, que comprende la etapa de expresar la secuencia de ácido nucleico o la colección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención, o el vector o colección de vectores de la presente invención, o la célula huésped, particularmente la célula huésped de expresión, de la presente invención.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método para generar un constructo multispecífico, que comprende la etapa de clonar, en una o más etapas, una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención, en un constructo multispecífico que comprende al menos un segundo dominio bioactivo, y, opcionalmente, uno o más dominios bioactivos adicionales.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un constructo polipeptídico multispecífico que comprende

(i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención; y (ii) un segundo dominio bioactivo; y, opcionalmente, (iii) uno o más dominios bioactivos adicionales.

En realizaciones particulares del sexto o séptimo aspecto, el segundo dominio bioactivo es un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 5 En realizaciones particulares, está presente al menos uno de dichos dominios bioactivos adicionales opcionales, particularmente en donde dicho dominio bioactivo adicional es un tercer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En realizaciones particulares, el constructo polipeptídico multiespecífico comprende además uno o más ligadores polipeptídicos.

- 10 En realizaciones particulares, dicho polipéptido multiespecífico es un polipéptido monomérico, particularmente un polipéptido monomérico en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención es un fragmento de anticuerpo scFv unido mediante un ligador a dicho segundo dominio bioactivo, particularmente en donde dicho segundo dominio bioactivo es un segundo fragmento de anticuerpo scFv.

- 15 En realizaciones particulares, dicho polipéptido multiespecífico es un polipéptido dimérico, particularmente un polipéptido dimérico, en donde la asociación de los dos polipéptidos está provocada por la asociación de dominios de VL y VH complementarios de fragmentos de anticuerpo comprendidos en dicho polipéptido multiespecífico. En tales realizaciones particulares, el polipéptido multiespecífico es un constructo de anticuerpo multiespecífico según la enseñanza del documento WO 2016/202457. En otras realizaciones particulares, el polipéptido multiespecífico es un constructo de diacuerpo de cadena sencilla (scDb). En otras realizaciones particulares, el polipéptido multiespecífico es un constructo Fab-scFv_n (siendo n un número entero seleccionado de 1, 2, 3, o 4) que emplea un ensamblaje heterodimérico de un fragmento Fab que consiste en VL-CL y VH-CH1 con un dominio constante que forma un andamiaje, al que se unen uno o más fragmentos scFv mediante ligadores flexibles.
- 20

- 25 En un octavo aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, o a un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para su uso como medicamento. En una realización, la presente invención se refiere a un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, en particular una enfermedad humana, en donde dicho constructo polipeptídico multiespecífico comprende un segundo dominio bioactivo que puede interactuar específicamente con una diana de relevancia terapéutica en la enfermedad correspondiente.
- 30

- Los términos “tratamiento”, “que trata”, “tratar”, “tratado”, y similares, tal como se usan en el presente documento, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser terapéutico en cuanto a curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad o retraso de la progresión de la enfermedad. “Tratamiento”, tal como se usa en el presente documento, abarca cualquier
- 35 tratamiento de una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, en un ser humano, e incluye: (a) inhibir la enfermedad, por ejemplo, deteniendo su desarrollo; y (b) aliviar la enfermedad, por ejemplo, provocando la regresión de la enfermedad.

- En un décimo aspecto, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, o un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en la fabricación de un medicamento.
- 40

- Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad, particularmente una enfermedad humana, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad, particularmente una enfermedad humana, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en donde dicho constructo polipeptídico multiespecífico comprende un segundo dominio bioactivo que puede interactuar específicamente con una diana de relevancia terapéutica en la enfermedad correspondiente.
- 45
- 50

El término “sujeto” incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, y reptiles. En una realización preferida, dicho sujeto es un ser humano. Excepto cuando se indique, los términos “paciente” o “sujeto” se usan de manera intercambiable en el presente documento.

- 55 El término “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad de un agente que, cuando se administra a un mamífero u otro sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento de la enfermedad. La “cantidad terapéuticamente eficaz” variará dependiendo del agente, la

enfermedad y su gravedad, así como de la edad, el peso, etc., del sujeto que va a tratarse.

Se describe además en el presente documento, pero no se reivindica, el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, o un constructo polipeptídico multiespecífico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, en el tratamiento de una enfermedad, particularmente una enfermedad humana, particularmente en donde dicho constructo polipeptídico multiespecífico comprende un segundo dominio bioactivo que puede interactuar específicamente con una diana de relevancia terapéutica en la enfermedad correspondiente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Selección y humanización

Para la generación del candidato principal del dominio de unión a HSA se seleccionaron 15 clones de anticuerpos monoclonales de conejo.

La humanización del clon seleccionado comprendía la transferencia de las CDR de conejo a una región de entramado aceptora de scFv del tipo V_K1/VH3 que comprendía una secuencia de región de entramado IV de V_λ tal como se describe en el documento WO 2014/206561. En este proceso, la secuencia de aminoácidos de las seis regiones CDR se identificó en la secuencia donante (AcM de conejo) y se injertó en la secuencia del andamiaje aceptor.

En los constructos finales se incluyeron aminoácidos adicionales del donante conejo en determinadas posiciones de la región de entramado que se ha descrito que pueden influir en el posicionamiento de las CDR y, por tanto, en la unión al antígeno (Borras *et al.*, 2010; J. Biol. Chem., 285:9054-9066) (véase la tabla 1). La comparación de los datos de caracterización de estos constructos reveló una ventaja significativa con respecto al injerto de CDR solo. Las secuencias de los dominios variables resultantes se muestran en la tabla 2.

Una vez completado el diseño de constructos *in silico* descrito en la sección anterior, se sintetizaron los genes correspondientes y se construyeron los vectores de expresión bacteriana. La secuencia de los constructos de expresión se confirmó a nivel del ADN y los constructos se fabricaron siguiendo protocolos genéricos de expresión y purificación.

La expresión heteróloga de las proteínas se realizó en *E. coli* como cuerpos de inclusión insolubles. El cultivo de expresión se inoculó con un cultivo inicial de crecimiento exponencial. El cultivo se realizó en matraces con agitación en un agitador orbital usando medios ricos disponibles comercialmente. Las células se hicieron crecer hasta una DO₆₀₀ definida de 2 y se indujeron mediante expresión durante la noche con β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 1 mM. Al final de la fermentación, las células se recogieron mediante centrifugación y se homogeneizaron por sonicación. En ese momento se determinó el nivel de expresión de los diferentes constructos mediante análisis por SDS-PAGE del lisado celular. Los cuerpos de inclusión se aislaron del sedimento celular homogeneizado mediante un protocolo de centrifugación que incluía varias etapas de lavado para retirar restos celulares y otras impurezas de la célula huésped. Los cuerpos de inclusión purificados se solubilizaron en un tampón desnaturante (Tris/HCl 100 mM pH 8,0, Gdn-HCl 6 M, EDTA 2 mM) y los scFv volvieron a plegarse mediante un protocolo de replegamiento escalable que generó cantidades de miligramos de scFv monoméricos plegados de manera nativa. Se empleó un protocolo estandarizado para purificar los scFv, que incluía las siguientes etapas. El producto tras el replegamiento se capturó mediante una cromatografía de afinidad empleando agarosa Capto L (GE Healthcare) para obtener los scFv purificados. Los candidatos principales que cumplían los criterios de afinidad y potencia en las pruebas iniciales se purificaron adicionalmente mediante una cromatografía de exclusión molecular de pulido empleando una columna HiLoad Superdex75 (GE Healthcare). Tras el protocolo de purificación, las proteínas se formularon en una solución salina tamponada y se caracterizaron.

Ejemplo 2: Caracterización de scFv humanizados

2.1. Afinidad a la albúmina sérica a pH 7,4 y pH 5,5

La afinidad de los scFv humanizados a la albúmina sérica (SA) de las diferentes especies se determinó mediante mediciones por SPR usando un dispositivo MASS-1 (Sierra Sensors). La SA se acopló directamente a un chip sensor de amina de alta capacidad (Sierra Sensors) usando química de acoplamiento de amina. Después de realizar una prueba de rendimiento de la superficie y exploración de la regeneración para encontrar las mejores condiciones de ensayo, se midió una respuesta a la dosis de scFv y las curvas de unión obtenidas se sometieron a doble referencia (canal de referencia vacío e inyección de analito cero) y se ajustaron usando el modelo de Langmuir 1:1 para recuperar los parámetros cinéticos. El ensayo se ejecutó dos veces a diferentes valores de pH: una vez en un tampón 1 X PBS-Tween a pH 5,5 y otra vez en un tampón 1 X PBS-Tween a pH 7,4.

Las mediciones de la cinética de unión para los constructos humanizados muestran una diferencia en la reactividad entre especies de los dos clones y diferencias cuantitativas en los injertos CDR y STR sometidos a prueba. Para

ambos pares de constructos, la incorporación de los residuos estructurales descritos condujo a una mejora de la afinidad. Para los constructos del clon 19-01-H04 la mejora de la afinidad fue de hasta 20 a 300 veces dependiendo de la especie sometida a prueba y del pH. Para los constructos del clon 23-13-A01, se consiguió una modesta mejora de unas 3 veces (véase la tabla 3).

- 5 En cuanto a reactividad entre especies, el clon 19-01-H04 muestra una unión de alta afinidad con la albúmina sérica de primates humanos y no humanos, mientras que no se observó ninguna unión con la SA de roedores. Para el clon 23-13-A01 se observó una unión de alta afinidad con la SA de primates humanos y no humanos, además las moléculas se unen con afinidad reducida a la SA de roedores (véase la tabla 4).

2.2. Unión de FcRn de HSA unida a anticuerpo

- 10 Se preparó un ensayo a pH 5,5 para confirmar que la HSA unida a scFv sigue pudiendo unirse al FcRn. Esto es necesario para permitir que el scFv anti-HSA o su derivado se reciclen con la HSA a través de la interacción entre la HSA y el FcRn. Se desarrolló un ensayo usando un chip inmovilizado con HSA: 1. Se inyectó scFv 90 nM y se midió la interacción a pH bajo; 2. Se inyectó FcRn 90 nM y se midió la interacción a pH bajo 3. Se inyectó una mezcla 1:1 de scFv y FcRn (90 nM cada uno) para ver si la suma de los niveles de unión de las inyecciones individuales se aproxima al nivel de unión cuando se inyecta la mezcla. Si la HSA unida al scFv ya no puede unirse al FcRn, el nivel de unión de la mezcla sería el mismo que el nivel de unión del scFv solo.
- 15

Usando este ensayo pudo confirmarse que la HSA tiene plena capacidad de unirse al FcRn cuando scFv de los clones 19-01-H04 y 23-13-A01 se unen a la misma.

Ejemplo 3: Generación de un formato de diacuerpo de cadena sencilla (scDb)

- 20 Para una mayor caracterización de las propiedades del dominio α HSA, los dominios preferidos se incorporaron en constructos multiespecíficos.

Para ambos dominios se prepararon constructos biespecíficos en el diacuerpo de cadena sencilla. El diseño del constructo en el formato de diacuerpo de cadena sencilla (scDb) se realizó tal como se describió previamente [Holliger *et al.*, "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6444-6448]. En resumen, los dominios variables enumerados en la tabla 1 se dispusieron de manera VLA-S1-VHB-L1-VLB-S2-VHA, donde S1 y S2 son ligadores G₄S cortos y L1 es un ligador (G₄S)₄ largo. Los constructos resultantes con los dominios α HSA y una segunda especificidad para un segundo antígeno se denominaron PRO462, en el caso de los dominios 19-01-H04-sc02, y PRO480, en el caso de los dominios 23-13-A01-sc02.

25

- Las secuencias de nucleótidos se sintetizaron *de novo* y se clonaron en un vector adaptado para la expresión en *E. coli* basado en una estructura principal de pET26b(+) (Novagen). El constructo de expresión se transformó en la cepa *E. coli* BL12 (DE3) (Novagen) y las células se cultivaron en medio 2YT (Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual) como cultivo inicial. Los cultivos de expresión se inocularon y se incubaron en matraces con agitación a 37 °C y 200 rpm. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ nm de 1, se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Después de la expresión durante la noche, las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 g. Para la preparación de los cuerpos de inclusión, el sedimento celular se resuspendió en tampón de resuspensión de IB (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 al 0,5 %). La suspensión celular se complementó con DTT 1 mM, lisozima 0,1 mg/ml, leupeptina 10 mM, PMSF 100 μ M y pepstatina 1 μ M. Las células se lisaron mediante 3 ciclos de homogeneización ultrasónica mientras se enfriaban en hielo. Posteriormente, se añadió 0,01 mg/ml de ADNasa y el homogeneizado se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los cuerpos de inclusión se sedimentaron por centrifugación a 15000 g y 4 °C. Los IB se resuspendieron en tampón de resuspensión de IB y se homogeneizaron por sonicación antes de otra centrifugación. En total se realizaron un mínimo de 3 etapas de lavado con tampón de resuspensión de IB y posteriormente 2 lavados con tampón de lavado de IB (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM) para obtener los IB finales.
- 30
- 35
- 40

- Para el repliegamiento de proteínas, los IB aislados se resuspendieron en tampón de solubilización (Tris/HCl 100 mM pH 8,0, Gdn-HCl 6 M, EDTA 2 mM) en una razón de 5 ml por g de IB húmedos. La solubilización se incubó durante 30 min a temperatura ambiente hasta que se añadió DTT a una concentración final de 20 mM y se continuó la incubación durante otros 30 min. Una vez completada la solubilización, la disolución se aclaró mediante 10 min de centrifugación a 21500 g y 4 °C. El repliegamiento se realizó por dilución rápida a una concentración final de proteína de 0,3 g/l de la proteína solubilizada en tampón de repliegamiento (típicamente: Tris-HCl 100 mM pH 8,0, urea 5,0 M, cisteína 5 mM, cistina 1 mM). La reacción de repliegamiento se incubó rutinariamente durante un mínimo de 14 h. La disolución de proteína resultante se aclaró mediante centrifugación de 10 min a 8500 g y 4 °C. La proteína replegada se purificó mediante cromatografía de afinidad en resina Capto L (GE Healthcare). La fracción monomérica aislada se analizó mediante HPLC de exclusión molecular, SDS-PAGE para determinar la pureza y espectroscopia UV/Vis para determinar el contenido de proteína. El tampón se cambió a tampón nativo (citrato-fosfato 50 mM pH 6,4, NaCl 200 mM) mediante diálisis. Las concentraciones de proteínas se ajustaron al valor previsto para el análisis de estabilidad.
- 45
- 50
- 55

Ejemplo 4: Caracterización funcional de los constructos de diacuerpo de cadena sencilla (scDb)

4.1 Desplegamiento térmico

El punto medio de transición para el desplegamiento térmico de los constructos sometidos a prueba se determinó mediante fluorimetría diferencial de barrido (DSF), esencialmente tal como describió Niesen (Niesen *et al.*, Nat Protoc. 2 (2007) 2212-21). El ensayo de DSF se realiza en una máquina de qPCR (por ejemplo, MX3005p, Agilent Technologies). Las muestras se diluyen en tampón (citratato-fosfato pH 6,4, NaCl 0,25 M) que contiene una concentración final de 5x SYPRO Orange en un volumen total de 25 µl. Las muestras se miden por triplicado y se programa una rampa de temperatura de desde 25-96 °C. Se adquiere la señal de fluorescencia y se analizan los datos sin procesar con GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.).

En la tabla 5 se muestran datos representativos creados usando constructos estrechamente relacionadas con los divulgados en esta solicitud.

4.2 Estudio de estabilidad frente a estrés

La proteína se analiza a lo largo del transcurso de cuatro semanas y almacenamiento a 37 °C con respecto a la oligomerización mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento con exclusión molecular (SE-HPLC) y la degradación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Antes del estudio, las muestras se concentran hasta 1 y se determinan los puntos de tiempo de partida. El contenido en monómeros se cuantifica mediante la separación de las muestras en un instrumento Shodex KW-402.5-4F (Showa Denko) y la evaluación de los cromatogramas resultantes. Para calcular el porcentaje relativo de monómero proteico se divide el área del pico monomérico entre el área total de los picos que no pueden atribuirse a la matriz de la muestra. La degradación de las proteínas se evalúa mediante análisis por SDS-PAGE con geles Any kD Mini-Protean TGX (Bio-Rad Laboratories) y teñidos con azul brillante de Coomassie. La concentración de proteínas se controla en los diferentes puntos de tiempo mediante espectroscopia UV-Vis con un lector Infinity M200 Pro equipado con una placa Nanoquant (Tecan Group Ltd.).

Los datos de estabilidad de PRO462 y PRO480 en combinación con la confirmación de la unión al antígeno mediante SPR muestran la estabilidad y la integridad estructural de los respectivos dominios αHSA en el contexto de un formato de anticuerpo multispecífico (véase la tabla 6).

Ejemplo 5: Generación del constructo PRO497 (Fab-scFv)₂

El formato Fab-(scFv)₂ es un derivado de anticuerpo recombinante multifuncional que emplea un ensamblaje heterodimérico de fragmentos Fab que consisten en VL-CL y VH-CH1 con cualquiera de los dominios constantes formando un andamiaje, sobre el que a través de ligadores flexibles pueden incorporarse dominios de unión adicionales, tales como los scFv (Schoonjans, Willems *et al.* 2001) (Schoonjans, Willems *et al.* 2000). Las moléculas pueden expresarse conjuntamente en células huésped de mamíferos, tales como CHO-S, donde la chaperona de inmunoglobulina de unión impulsa la heterodimerización de los dominios de VL-CL y VH-CH1, incluso en presencia de extensiones de cadena. Estos heterodímeros son estables, conservando cada uno de los aglutinantes sus afinidades específicas. Las fusiones de ScFv en las posiciones CL y CH1 de la molécula Fab-(scFv)₂ se consideran equivalentes. Los únicos fragmentos de secuencia no naturales en la molécula son los ligadores peptídicos que conectan los dominios variables dentro de los dominios de scFv y los dominios de scFv con los dominios constantes de Fab se componen de polímeros de glicina-serina que no se consideran antigénicos ni inmunogénicos. PRO497 es una molécula Fab-(scFv)₂ que comprende una porción de Fab específica anti-CD3 (09-24-H09-sc04) con un dominio de scFv específico anti-HSA (23-13-A01-sc02) fusionado al dominio de CL y un dominio de scFv específico anti-IL23R (14-11-D07-sc04) fusionado al dominio de CH1. Los dominios dentro de los dominios de scFv están conectados mediante ligadores (G₄S)₄ de 20 aminoácidos mientras que los dominios de scFv individuales están fusionados mediante ligadores peptídicos (G₄S)₃ de 15 aminoácidos al fragmento Fab.

Schoonjans, R., A. Willems, J. Grooten y N. Mertens (2000). "Efficient heterodimerization of recombinant bi- and trispecific antibodies". Bioseparation 9(3): 179-183.

Schoonjans, R., A. Willems, S. Schoonooghe, W. Fiers, J. Grooten y N. Mertens (2000). "Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives". J Immunol 165(12): 7050- 7057.

Ejemplo 6: Caracterización funcional del constructo PRO497 mediante estudios de PK *in vivo*

Farmacocinética de PRO497 en ratones

El objetivo de este estudio fue determinar la farmacocinética de PRO497 tras su administración intravenosa a ratones CD-1 macho. Se administraron 5 mg/kg de PRO497 por vía intravenosa a 12 animales. Se recogieron muestras de sangre antes de la dosis, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h y 144 h tras la dosis. Tras la extracción, la sangre completa para suero se colocó en tubos separadores de suero y se dejó coagular. Se observaron las muestras para detectar la presencia de retracción del coágulo y se centrifugaron [2200 x g durante 10

minutos a temperatura ambiente]. Las muestras de suero se transfirieron a viales individuales de polipropileno y se colocaron inmediatamente en hielo seco antes de su almacenamiento a -70 ± 10 °C.

- 5 Las concentraciones de PRO497 en suero se analizaron mediante un ELISA cuantitativo para la detección de PRO479 en suero de ratón (figura 2). Los parámetros farmacocinéticos se estimaron mediante el software de farmacocinética Watson (Thermo Electron Corporation, versión n.º 7.2.0.02), empleando un enfoque no compartimental coherente con la vía de administración intravenosa.

Ejemplo 7: Caracterización funcional del constructo PRO462 mediante estudios de PK *in vivo*

Farmacocinética de PRO462 en macaco cangrejero

- 10 Se determinó la farmacocinética de PRO462 tras su administración intravenosa a macacos cangrejeros macho. Un total de tres animales tratados previamente recibieron una única administración de PRO462 a un nivel de dosis objetivo de 3 mg/kg. El suero se preparó a partir de muestras de sangre recogidas en los siguientes puntos de tiempo:

Antes de la dosis, 10 y 30 min y 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 144, 192, 240, 288, 336, 384, 432 y 504 h tras la dosis.

- 15 Las concentraciones de PRO462 en suero se analizaron mediante un ELISA cuantitativo (figura 1). Los parámetros farmacocinéticos se estimaron mediante el software de farmacocinética WinNonlin (Phoenix versión 1.4) usando un enfoque no compartimental.

Tabla 1: Residuos de conejo injertados además de las regiones CDR (numeración según AHo)

ID de clon	Injerto	Residuos estructurales injertados
19-01-H04-sc01	CDR	
19-01-H04-sc02	STR	VL: (K50Q; A51P) VH: (W54Y; V103T; Y105F)
23-13-A01-sc01	CDR	
23-13-A01-sc02	STR	VL: (I2V, Q3V, K50Q, A51P) VH: (I55V, V103T, Y105F)

Tabla 2: Lista de secuencias, que muestra los residuos de CDR en letra en negrita

ID de secuencia (SEQ ID)	Descripción	Secuencia
1	VL anti-HSA 19-01-H04-sc02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC Q SESVYNNQLSWYQQKPGQPPKLLIY DASDLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY CAGGFS SSD TAF GGG TKLTVLG
2	VH anti-HSA 19-01-H04-sc02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG FLSS NAMG WWRQAPGKGLEYIGI ISVGGFT YYASWAKGR FTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAEDTATYFCARD RHGGDSSGAFYLVWG QGTLVTVSS
3	VL anti-HSA 23-13-A01-sc02	DVMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQ ISSRS AWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY CQCTYID SN FGA FGG TKLTVLG
4	VH anti-HSA 23-13-A01-sc02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG FS SS YWICWWRQAPGKGLEW GCVFTG DGTTYASWAKGR FTISRDN SKNTVYLQ MNSLRAEDTATYFCAR PVSVYYGMDLW GGTLVTVSS
5	Ligador	GGGSGGGGGGGGGGGG
6	FR4 basado en línea geminal de V _L (Sk17)	FGTG TKLTVLG
7	FR4 basado en línea geminal de V _L (Sk12)	FGG TKLTVLG

(en las SEQ ID NO: 1 a 4, las CDR se indican en letras en negrita y en cursiva)

Tabla 3: Medición de afinidad de constructos de scFv humanizados derivados de los clones 19-01-H04 y 23-13-A01. Se determinó la cinética de unión para albúmina sérica humana y de macaco cangrejero a pH 5,5 y pH 7,4.

ID de clon	Afinidad por SA humana pH 5,5 (SPR)				Afinidad por SA humana pH 7,4 (SPR)				Afinidad por SA de macaco cangrejero pH 5,5 (SPR)				Afinidad por SA de macaco cangrejero pH 7,4 (SPR)			
	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]		k_d [s^{-1}]		K_D [M]		k_a [s^{-1}]		k_d [s^{-1}]		K_D [M]		k_a [$M^{-1} s^{-1}$]		k_d [s^{-1}]	
	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
19-01-H04-sc01	CDR	1,78E+05	2,32E-03	1,30E-08	1,02E+05	3,43E-03	3,36E-08	1,35E+04	1,57E-03	1,16E-07	1,18E+05	2,37E-03	2,01E-08			
19-01-H04-sc02	STR	4,50E+05	3,08E-04	6,84E-10	3,84E+05	4,11E-04	1,07E-09	5,98E+05	2,31E-04	3,87E-10	4,24E+05	3,02E-04	7,11E-10			
23-13-A01-sc01	CDR	1,14E+05	1,24E-04	1,09E-09	8,21E+04	2,11E-04	2,57E-09									
23-13-A01-sc02	STR	3,07E+05	1,15E-04	3,73E-10	3,23E+05	1,94E-04	6,00E-10	3,38E+05	2,53E-04	7,50E-10	3,34E+05	4,33E-04	1,30E-09			

Tabla 4: Medición de afinidad de constructos de scFv humanizados derivados de los clones 19-01-H04 y 23-13-A01. Se determinó la cinética de unión para albúmina sérica de ratón y de rata a pH 5,5 y 7,4. Se determinaron las mediciones de albúmina sérica de titís a pH 5,5.

ID de clon	Afinidad por SA de ratón pH 5,5 (SPR)				Afinidad por SA de ratón pH 7,4 (SPR)				Afinidad por SA de rata pH 5,5 (SPR)				Afinidad por SA (purificada) de titís pH 5,5 (SPR)			
	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]		k_d [s^{-1}]		K_D [M]		k_a [s^{-1}]		k_a [$M^{-1} s^{-1}$]		k_d [s^{-1}]		k_a [$M^{-1} s^{-1}$]		k_d [s^{-1}]	
	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	K_D [M]	k_d [s^{-1}]	K_D [M]
19-01-H04-sc01	CDR															
19-01-H04-sc02	STR															
23-13-A01-sc01	CDR	4,83E+04	8,63E-04	1,78E-08					1,20E+05	2,83E-03	2,37E-08		3,86E+06	2,60E-03	6,74E-10	
23-13-A01-sc02	STR	1,92E+05	9,33E-04	4,86E-09	1,46E+05	4,69E-03	3,22E-08	2,34E+05	4,37E-03	3,87E-08	1,06E+05	2,46E-02	2,31E-07	3,38E+05	1,28E-03	3,77E-09

Tabla 5: Punto medio de desplegamiento tal como se mide mediante DSF de α HSA que contiene scDb

ID de proteína	Temperatura de fusión °C
PRO462	60,5
PRO480	60,1

Tabla 6: Resultados de SE-HPLC del estudio de estabilidad llevado a cabo con PRO462 y PRO480

ID de proteína	Temp. de almacenamiento	Contenido monomérico										Pérdida de contenido monomérico									
		%										%									
		°C	d0	d1	d2	d7	d14	d21	d28	d1	d2	d7	d14	d21	d28	d1	d2	d7	d14	d21	d28
PRO462	4°C		100,0	100,0	99,7	99,7	99,3	99,8	99,3	0,0	0,3	0,3	0,7	0,2	0,6						
	37 °C		100,0	99,6	96,8	99,3	98,7	98,9	98,3	0,3	3,2	0,7	1,3	1,1	1,7						
	-80°C								99,3												0,7
PRO480	4°C		100,0	99,9	99,3	99,6	98,5	99,7	98,5	0,1	0,7	0,4	1,5	0,3	1,5						
	37 °C		100,0	99,2	99,7	98,8	97,9	98,3	97,6	0,8	0,3	1,1	2,1	1,6	2,3						
	-80°C								98,7												1,2

Tabla 7: Datos de medición medidos mediante SPR para PRO462 y PRO 480

ID de proteína	Afinidad por albúmina sérica humana pH 5,5		Afinidad por albúmina sérica humana pH 7,4		Afinidad por albúmina sérica macaco cangrejero pH 5,5		Afinidad por albúmina sérica macaco cangrejero pH 7,4	
	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	k_a [$M^{-1} s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]
PRO462	8,97E+05	3,33E-04	3,71E-10	4,74E+05	3,45E-04	7,28E-10	1,00E+06	1,75E-04
PRO480	7,50E+04	1,73E-04	2,30E-09	7,01E+04	2,35E-04	3,36E-09	7,76E+04	3,73E-04

Tabla 8: Datos subyacentes al gráfico mostrado en la figura 1

ID	C0 (ng/ml)	AUC(0-t) (ng.h/ml)	AUC(0-inf) (ng.h/ml)	CL (ml .h/kg)	Vd (ml /kg)	T _{1/2} (h)
PRO462	71.200	4.600.000	6.800.000	0,446	96,0	150 (6,3 días)
	± 11.100	± 440.000	± 624.000	± 0,0468	± 14,8	± 18,9 (0,8 días)

Tabla 9: Datos subyacentes al gráfico mostrado en la figura 2

ID	C0 (ng/ml)	AUC(0-t) (ng.h/ml)	AUC(0-inf) (ng.h/ml)	CL (ml .h/kg)	Vd (ml /kg)	T _{1/2} (h)
PRO497	100.412	2.350.000	2.500.000	0,0355	70,5	39,7 (1,7 days)
	± 12.159					

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es específico para albúmina sérica humana, que comprende
5 (i) una cadena ligera variable con una secuencia según SEQ ID NO: 1, y una cadena pesada variable con una secuencia según SEQ ID NO: 2, o (ii) una cadena ligera variable con una secuencia según SEQ ID NO: 3, y una cadena pesada variable con una secuencia según SEQ ID NO: 4.
2. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, y opcionalmente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Secuencia de ácido nucleico o una colección de secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1.
10
4. Vector o una colección de vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico o la colección de secuencias de ácido nucleico según la reivindicación 3.
5. Método para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que comprende la etapa de expresar la secuencia de ácido nucleico o la colección de secuencias de ácido nucleico según la reivindicación 3, o el vector o colección de vectores según la reivindicación 4.
15
6. Método para generar un constructo multiespecífico, que comprende la etapa de clonar, en una o más etapas, una o más secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en un constructo multiespecífico que comprende al menos un segundo dominio bioactivo, y, opcionalmente, uno o más dominios bioactivos adicionales.
7. Método según la reivindicación 6, en donde dicho segundo dominio bioactivo es un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.
20
8. Constructo polipeptídico multiespecífico que comprende (i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1; y (ii) un segundo dominio bioactivo; y, opcionalmente, (iii) uno o más dominios bioactivos adicionales.
9. Constructo polipeptídico multiespecífico según la reivindicación 8, en donde dicho segundo dominio bioactivo es un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.
25
10. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, o composición farmacéutica según la reivindicación 2, o constructo polipeptídico multiespecífico según la reivindicación 8 ó 9 para su uso como medicamento.
30

FIGURA 1:

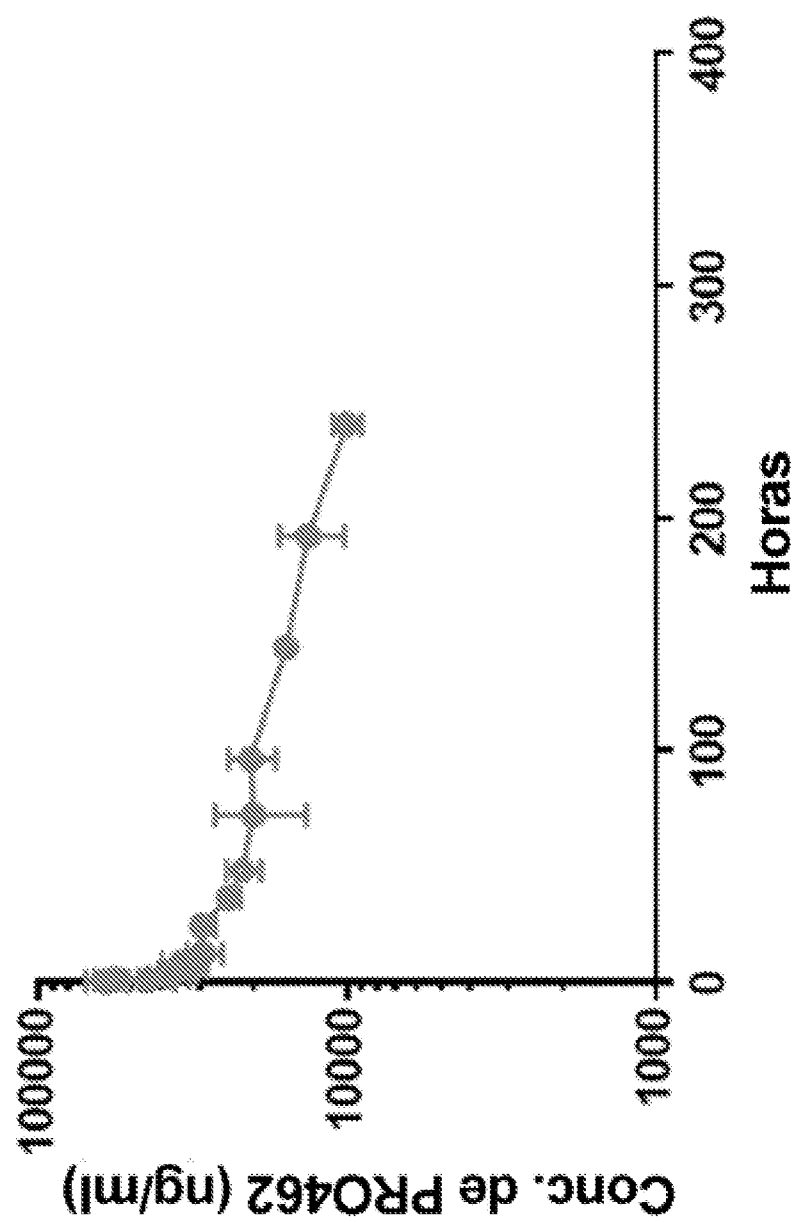


FIGURA 2:

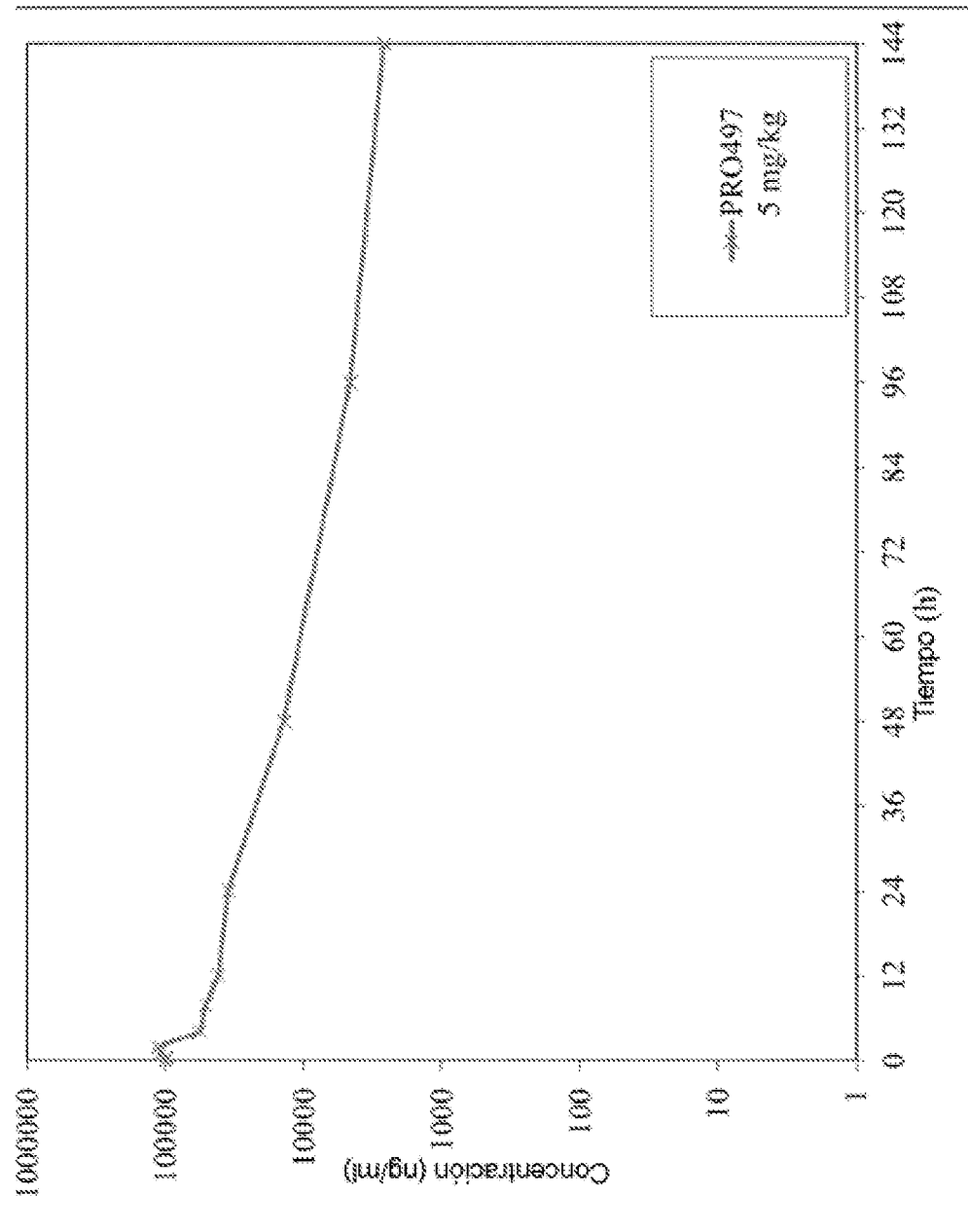


FIGURA 3:

