



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 431**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 16/40** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03786140 .8**  
96 Fecha de presentación : **24.12.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1581559**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54 Título: **Fusión de Fc con dAb de V<sub>L</sub>.**

30 Prioridad: **27.12.2002 GB 0230203**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.10.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.10.2010**

73 Titular/es: **Domantis Limited**  
**980 Great West Road**  
**Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es: **Winter, Greg;**  
**Tomlinson, Ian;**  
**Ignatovich, Olga y**  
**Brewis, Neil**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Fusión de Fc con dAb de  $V_L$ .

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento sencillo para generar moléculas de anticuerpo adecuadas para su uso *in vivo*. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la generación de moléculas de anticuerpo adecuadas para su uso *in vivo* que se basan en dominios variables sencillos de anticuerpo.

## Introducción

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

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

- 45 Históricamente, se han obtenido anticuerpos a partir de fuentes naturales tales como por inmunización de conejos y otros animales de este tipo. Como alternativa, pueden emplearse técnicas de biología molecular y pueden generarse anticuerpos usando técnicas tales como las que implican el uso de hibridomas híbridos.

- 50 De este modo, pueden generarse anticuerpos de una especificidad de unión a antígeno seleccionada o deseada. Dichos anticuerpos son de gran valor terapéutico ya que pueden diseñarse, por ejemplo, contra antígenos patológicos. Sin embargo, el procedimiento de producción de estos anticuerpos es laborioso y con tendencia a errores, además de estar limitado a la diversidad resultante de la historia de inmunización del donante. Sería una ventaja generar una mayor diversidad, por ejemplo, usando bibliotecas sintéticas. Por lo tanto, continúa existiendo en la técnica la necesidad de un procedimiento sencillo para generar moléculas de anticuerpo funcionalmente activas de una especificidad de unión a antígeno deseada o predeterminada.

- Se han descrito dominios variables de cadena pesada sencillos, derivados de anticuerpos naturales que normalmente comprenden cadenas ligeras, a partir de anticuerpos monoclonales o de repertorios de dominios (documento EP-A-0368684). Estos dominios variables de cadena pesada se ha demostrado que interactúan específicamente con uno o más antígenos (Ward y col.). Sin embargo, estos dominios sencillos se ha demostrado que tienen una semivida *in vivo* muy corta. Por lo tanto, dichos dominios son de un valor terapéutico limitado.

- 65 Además, el documento EP 0 656 946 A1 describe moléculas de inmunoglobulina de doble cadena que se unen a antígeno específicamente y en las que las cadenas polipeptídicas pesadas están desprovistas de dominios de cadena pesada CH1, estando también la inmunoglobulina desprovista de cadenas polipeptídicas ligeras. Dichos anticuerpos son de origen natural en camélidos y, por lo tanto, como tales, la especificidad de antígeno del anticuerpo está limitada a la generada por el camélido.

También son dignos de atención estudios realizados sobre la Enfermedad de Cadenas Pesadas. En esta enfermedad se generan moléculas de inmunoglobulina que comprenden un dominio variable de cadena pesada, dominios CH2 y CH3, pero carecen de un dominio CH1 y de cadenas ligeras. Se ha descubierto que dichas moléculas se acumulan en la Enfermedad de Cadenas Pesadas (Block y col, Am J. Med, 55,61-70 (1973), Ellman y col, New Engl. J. Med, 278: 95-1201 (1968)). Por lo tanto, la técnica anterior de la Enfermedad de Cadenas Pesadas enseña que los anticuerpos que comprenden un solo tipo de dominio de interacción con antígeno sencillo (en este caso, dominios variables de cadena pesada) están asociados con la enfermedad. Es decir, la técnica anterior está lejos de enseñar el uso de anticuerpos basados únicamente en dominios variables de cadena pesada humana para uso profiláctico y/o terapéutico.

La solicitud de patente internacional WO88/09344 (Creative Biomolecules) describe construcciones de anticuerpo que comprenden engarces para unir dominios.

El documento EP-A-0368684 describe un ligando de dominio sencillo constituido por al menos parte del dominio variable de una cadena de una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

El documento US 6.248.516 se refiere a una biblioteca para la expresión de dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina (dominios VH), comprendiendo dicha biblioteca un repertorio de secuencias de ácido nucleico que codifican una tercera CDR de un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina.

El documento WO 02/085945 describe un procedimiento para la producción de un anticuerpo de cadena pesada sencilla VHH en un mamífero, que comprende la etapa de expresar un locus de cadena pesada VHH heterólogo en ese mamífero.

El documento WO 94/04678 describe una inmunoglobulina que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas suficientes para la formulación de un sitio de unión a antígeno completo o varios sitios de unión a antígeno, estando la inmunoglobulina desprovista además de cadenas polipeptídicas ligeras.

El documento US 5.869.046 describe un procedimiento para preparar un Fab o (FAB')<sub>2</sub> variante que contiene un dominio de Ig o dominio tipo Ig que comprende al menos una de una región CH1 o C<sub>L</sub> que se elimina del riñón y no contiene una región Fc de una IgG.

El documento WO 02/44215 describe una molécula de unión que comprende (i) uno o más polipéptidos que forman un sitio de unión capaz de unirse a una molécula diana y (ii) un péptido efector Fc que presenta una o más funciones efectoras asociadas con la región constante (Fc) de una cadena pesada de inmunoglobulina.

Powers y col (2001) (J. Immunol. Methods 251: 123-135) describen la expresión de fusiones de Fc-Fv de cadena sencilla en *Pichia pastoris*.

Riechmann y Muldermans (1999) (J. Immunol. Methods 231: 25-38) analizan anticuerpos de dominio sencillo y comparan dominios V<sub>H</sub> de camello y V<sub>H</sub> humanos camelizados.

Soloman y col (1998) (PNAS. 95: 9547 - 9551) describen depósitos amiloides asociados con cadena ligera compuestos por un nuevo dominio constante  $\kappa$ .

El documento US 3.907.502 describe un procedimiento para la detección, tipificación y evaluación cuantitativa de proteínas de Bence Jones en fluidos biológicos.

El documento WO 98/20140 se refiere a una composición que comprende una proteína sustancialmente purificada que tiene actividad enzimática de liberación del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF-R), teniendo la proteína una forma nativa que presenta un peso molecular aparente de aproximadamente 120 kD.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de un procedimiento sencillo y no laborioso para la generación de moléculas basadas en anticuerpos de una especificidad de unión a antígeno deseada o predeterminada no necesariamente limitada por la pre-exposición del donante a antígenos que sean adecuados para uso profiláctico y/o terapéutico.

## Sumario de la invención

Los presentes inventores han elaborado un procedimiento sencillo y no laborioso para la síntesis de moléculas basadas en anticuerpos de una especificidad de unión a epítopo seleccionada, que son adecuadas para su uso profiláctico y/o terapéutico *in vivo*. Significativamente, el procedimiento de la invención permite la síntesis de moléculas basadas en anticuerpos de cadena sencilla de una especificidad de unión a epítopo deseada o predeterminada. El uso de este procedimiento sencillo es sorprendente a la luz de la técnica anterior de la Enfermedad de Cadenas Pesadas que está lejos de enseñar el uso terapéutico de anticuerpos constituidos sólo por cadena pesada.

Estructuralmente, las moléculas de la presente invención comprenden un dominio variable sencillo de anticuerpo que tiene una especificidad de unión a epítopo definida o predeterminada y una o más regiones constantes de anticuerpo y/o región de bisagra (denominadas en su conjunto ("grupo efector")). Dicha molécula se denomina inmunoglobulina

## ES 2 346 431 T3

de dominio sencillo-grupo efector (dAb-grupo efector) y los presentes inventores consideran que dicha molécula será de un valor terapéutico considerable.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para sintetizar una inmunoglobulina de dominio sencillo-grupo efector (dAb-grupo efector) adecuada para uso *in vivo*, que comprende las etapas de:

(a) seleccionar un dominio variable sencillo de anticuerpo que tiene una especificidad de unión a epítipo; y

(b) unir el dominio sencillo de la etapa (a) a un grupo efector de inmunoglobulina

en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo es un dominio variable de cadena ligera.

De acuerdo con la presente invención, preferentemente el dominio sencillo de anticuerpo es un dominio sencillo de anticuerpo que no es de camélido. Ventajosamente, es un dominio variable sencillo de origen humano.

En otra realización, el dominio variable sencillo comprende regiones flanqueantes que no son de camélido (por ejemplo, humanas) (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 regiones flanqueantes humanas). Ventajosamente, una o más de las regiones flanqueantes humanas (según se definen por Kabat) son idénticas a nivel de los aminoácidos a las codificadas por genes de anticuerpo de la línea germinal humana.

Pueden usarse secuencias de región variable, por ejemplo, en la base de datos de Kabat de secuencias de interés inmunológico, u otras secuencias de anticuerpo conocidas o identificables por los expertos en la materia para generar un dAb-grupo efector como se describe en el presente documento. La base de datos de Kabat u otras bases de datos de este tipo incluyen secuencias de anticuerpo de numerosas especies.

Las CDR y regiones flanqueantes son las regiones de un dominio variable de inmunoglobulina según se define en la base de datos de Kabat de Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico. Las regiones flanqueantes humanas preferidas son las codificadas por el segmento génico de la línea germinal DPK9. Ventajosamente, FW1, FW2 y FW3 de un dominio  $V_L$  tienen la secuencia de FW1, FW2 o FW3 de DPK9. Las regiones flanqueantes humanas pueden contener opcionalmente mutaciones, por ejemplo, hasta aproximadamente 5 cambios de aminoácidos o hasta aproximadamente 10 cambios de aminoácidos en su conjunto en las regiones flanqueantes humanas usadas en los ligandos de la invención.

Ventajosamente, los dominios variables sencillos de anticuerpo usados de acuerdo con los procedimientos de la presente invención se aíslan, al menos en parte, por inmunización de seres humanos. Ventajosamente no se aíslan por inmunización de animales.

En una realización, el dominio variable sencillo comprende un sitio de unión para un ligando genérico según se define en el documento WO 99/20749. Por ejemplo, el ligando genérico es la Proteína L.

Como se define en el presente documento, la expresión “molécula de inmunoglobulina de dominio sencillo-grupo efector” (dAb-grupo efector) describe una molécula de inmunoglobulina obtenida por ingeniería genética que comprende un dominio variable sencillo capaz de unirse específicamente a uno o más epítopes, unido a uno o más dominios de región constante y/o bisagra (denominados en su conjunto “grupo efector”). El dominio variable es un dominio de cadena ligera ( $V_L$ ). Cada dominio de cadena ligera puede ser del subgrupo kappa o lambda. Ventajosamente, un grupo efector como se describe en el presente documento comprende una región Fc de un anticuerpo.

Los dAb-grupos efectores pueden combinarse para formar estructuras multivalentes, incluyendo cualquiera de los seleccionados del grupo constituido por los siguientes: homodímeros, heterodímeros y multímeros. Dichas estructuras multiméricas tienen una mejor avidéz de interacción de antígeno gracias a las estructuras multiméricas que tienen más de un sitio de unión a epítipo, en el que los epítopes están en el mismo antígeno. Cuando los epítopes están en antígenos diferentes, por ejemplo los que están próximos entre sí en la misma superficie celular, estos epítopes pueden enlazarse por dAb-grupos efectores.

Para evitar dudas, los dAb-grupos efectores de acuerdo con la invención no incluyen los anticuerpos de doble cadena que se describen en el documento EP-A-0656946, así como fragmentos de cadena sencilla  $V_{HH}$  desvelados en el presente documento, tales como fragmentos VHH-bisagra, basados en inmunoglobulinas de camélido. Además, la expresión “dAb-grupo efector” no incluye en su alcance los anticuerpos de doble cadena de origen natural generados dentro de los camélidos. La expresión “dAb-grupo efector” tampoco incluye en su alcance la estructura de cuatro cadenas de moléculas de anticuerpo de IgG que comprende dos cadenas ligeras y dos pesadas o cadenas pesadas o ligeras sencillas derivadas a partir de las mismas.

Como se ha mencionado anteriormente, la expresión “adecuado para su uso *in vivo*” significa que el “dAb-grupo efector” de acuerdo con la presente invención tiene una semivida suficiente de modo que la molécula está presente dentro del cuerpo durante un tiempo suficiente para producir uno o más efectos biológicos deseados. A este respecto, los presentes inventores han descubierto que el tamaño y la naturaleza del grupo efector influyen en la semivida de los dAb-grupos efectores de acuerdo con la invención.

Un grupo efector preferido de acuerdo con la presente invención es o comprende la región Fc de una molécula de anticuerpo. Dicho grupo efector permite la unión a receptores de Fc (por ejemplo, uno o ambos receptores de Fc CD64 y CD32) y la activación del complemento por medio de la interacción con C1q, mientras que al mismo tiempo proporciona a la molécula una mayor semivida que un dominio de cadena pesada variable sencillo en aislamiento.

Como se usa en el presente documento, el término “epítipo” es una unidad de estructura unida convencionalmente por un sitio de unión a antígeno como se proporciona por uno o más dominios variables, por ejemplo, un par de  $V_H/V_L$  de inmunoglobulina. Los epítopos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo y, por lo tanto, representan la diana de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio sencillo, un epítipo representa la unidad de estructura unida por un dominio variable aislado de cualquier otro dominio variable.

Como se usa en el presente documento, el término “seleccionar” (un dominio variable de anticuerpo) incluye dentro de su alcance la selección de (un dominio variable de anticuerpo) de varias alternativas diferentes. Las técnicas para la “selección” de dominios variables de anticuerpos serán conocidas para los expertos en la técnica. El término “selección” (de un dominio variable de anticuerpo) incluye dentro de su alcance la “selección” de uno o más dominios variables por exploración de bibliotecas. Ventajosamente, la selección implica la exploración de un repertorio de dominios variables de anticuerpo presentados en las superficies de bacteriófagos dentro de una biblioteca de presentación en fagos (McCafferty y col, (1990) Nature 340, 662-654) o sistemas *in vitro* basados en emulsión (Tawfik & Griffiths (1998) Nature Biotechnol 16(7), 652-6).

Como se usa en el presente documento, el término “unir” (el dominio sencillo que se describe en el presente documento a un grupo efector) incluye dentro de su alcance la unión directa de un dominio sencillo como se describe en el presente documento a una o más regiones constantes como se describen en el presente documento. También incluye la unión indirecta de un dominio sencillo a un grupo efector por medio, por ejemplo, de un grupo adicional y/o de una región de engarce. Además, el término “unir” incluye dentro de su alcance una asociación de los grupos respectivos de modo que la asociación se mantenga *in vivo*, de manera que el dAb-grupo efector es capaz de producir efectos biológicos, tales como aumentar la semivida (es decir, tiempo de permanencia en suero del dominio variable) y permitir que se aprovechen los atributos funcionales de, por ejemplo, regiones constantes, tales como regiones Fc, *in vivo*.

En una realización preferida, el dominio variable y el grupo efector se unen directamente, sin el uso de un engarce.

En el caso de que se use un engarce para unir un dominio variable a uno o más dominios de región constante, el engarce es ventajosamente un engarce polipeptídico. Un experto en la materia apreciará que la longitud y composición del engarce pueden afectar a las características físicas del dAb-grupo efector. Por lo tanto, un engarce corto puede minimizar el grado de libertad del movimiento presentado por cada grupo respecto al otro, mientras que un engarce más largo puede permitir mayor libertad de movimiento. Asimismo, aminoácidos voluminosos o cargados también pueden restringir el movimiento de un dominio respecto al otro. Se proporciona un análisis de engarces adecuados en Bird y col. Science 242, 423-426. Hudson y col, Journal Immunol Methods 231 (1999) 177-189; Hudson y col, Proc Nat Acad Sci USA 85, 5879-5883. Un ejemplo es un engarce  $(Gly_4 Ser)_n$  en el que  $n=1$  a 8, por ejemplo, 2, 3 ó 4.

La unión de un dominio variable sencillo a un grupo efector, como se define en el presente documento, puede conseguirse a nivel del polipéptido, es decir después de la expresión del ácido nucleico que codifica los dominios y grupos respectivos. Como alternativa, la etapa de unión puede realizarse a nivel del ácido nucleico. Los procedimientos de unión incluyen el uso de química de proteínas y/o técnicas de biología molecular con las que estarán familiarizados los expertos en la materia y se describen en el presente documento.

Como se define en el presente documento, la expresión “dominio variable sencillo de anticuerpo que no es de camélido” se refiere a un dominio variable sencillo de anticuerpo que no procede de camélido. El dominio variable sencillo de anticuerpo que no es de camélido puede seleccionarse de un repertorio de dominios sencillos, por ejemplo, de los representados en una biblioteca de presentación en fagos. Como alternativa, pueden proceder de moléculas de anticuerpo nativas. Los expertos en la materia serán conscientes de fuentes adicionales de dominios variables sencillos de anticuerpo que no proceden de camélido.

Los dominios variables sencillos de anticuerpo son dominios variables de cadena ligera ( $V_L$ ). Cada dominio variable de cadena  $V_L$  es del subgrupo  $V_{\kappa}$  ( $V_{\kappa}$ ) o  $V_{\lambda}$  ( $V_{\lambda}$ ).

De acuerdo con una realización de la presente invención, un dominio variable de anticuerpo ( $V_L$ ) se une a uno o más dominios pesados de región constante de anticuerpo. Dichos uno o más dominios de cadena pesada constante constituyen un “grupo efector” de acuerdo con la presente invención.

En una realización, cada dominio  $V_L$  se une a una región Fc (un grupo efector) de un anticuerpo. Ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención es  $V_L$ -Fc. En el caso de que el grupo efector sea una región Fc de un anticuerpo, entonces el dominio CH3 facilita la interacción de un dAb-grupo efector con receptores de Fc mientras que el dominio CH2 permite la interacción de un dAb-grupo efector con C1q, facilitando de este modo la activación del sistema del complemento. Además, los presentes inventores han descubierto que la porción Fc del anticuerpo estabiliza el dAb-grupo efector y proporciona a la molécula una semivida adecuada para uso terapéutico y/o profiláctico *in vivo*.

Otros grupos efectores adecuados incluyen cualquiera de los seleccionados del grupo constituido por los siguientes: un grupo efector que comprende al menos una región constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), un dominio de cadena pesada CH1 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH3 de anticuerpo, o cualquier combinación de los mismos. Además de dichos uno o más dominios de región constante, un grupo efector también puede comprender una región de bisagra de un anticuerpo (tal como una región que se encuentra normalmente entre los dominios CH1 y CH2 de una molécula de IgG). En una realización adicional del aspecto anterior de la invención, el grupo efector es una región de bisagra en solitario de modo que el dAb-grupo efector comprende un dominio variable sencillo unido a la región de bisagra de una molécula de anticuerpo.

De acuerdo con la presente invención, ventajosamente un grupo efector como se describe en el presente documento es o comprende los dominios de región constante CH2 y/o CH3. Ventajosamente, el grupo efector comprende CH2 y/o CH3, preferentemente un grupo efector como se describe en el presente documento está constituido por dominios CH2 y CH3, opcionalmente unidos a una región de bisagra de una molécula de anticuerpo como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un “dAb-grupo efector” que puede obtenerse usando los procedimientos de la presente invención. Para evitar cualquier duda, los “dAb-grupos efectores” de acuerdo con la presente invención no incluyen dentro de su alcance la estructura de cuatro cadenas de moléculas de IgG ni la estructura de doble cadena de anticuerpos de camélido de origen natural o las descritas en el documento EP 0 656 946 A1.

Los dominios variables sencillos de anticuerpo son dominios variables de cadena ligera ( $V_L$ ). Cada dominio variable de cadena  $V_L$  es del subgrupo  $V_kappa$  ( $V_K$ ) o  $V_lambda$  ( $V_\lambda$ ). El uso de dominios  $V_L$  tiene la ventaja de que estos dominios, a diferencia de los dominios de cadena pesada variables ( $V_H$ ), no poseen superficies de contacto hidrófobas que son “pegajosas” y pueden causar problemas de solubilidad en el caso de dominios  $V_H$  aislados.

Estructuralmente, las moléculas de inmunoglobulina de grupo efector de dominio sencillo de acuerdo con la presente invención comprenden dominios  $V_L$  como se han descrito anteriormente.

De acuerdo con el aspecto anterior de la invención, ventajosamente el dAb-grupo efector obtenido por los procedimientos de la invención es un  $V_H$ -Fc o un  $V_L$ -Fc. Más ventajosamente, el dAb-grupo efector es  $V_L$ -Fc. En una realización alternativa de este aspecto de la invención, el dAb-grupo efector es  $V_H$ -bisagra. En una realización alternativa más, el dAb-grupo efector es un  $V_k$ -Fc. Los presentes inventores han descubierto que la porción Fc del anticuerpo estabiliza el dAb-grupo efector, proporcionando a la molécula una semivida adecuada.

En una realización alternativa de este aspecto de la invención, el grupo efector se basa en un fragmento de anticuerpo Fab. Es decir, comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio  $V_H$  o un dominio  $V_L$  unido a uno o más dominios de región constante que componen un fragmento Fab. Un experto en la materia apreciará que dicho fragmento comprende sólo un dominio variable. Dichos grupos efectores de Fab se ilustran en la Figura 1.

En la Figura 1 se ilustran diversos “dAb-grupos efectores” preferidos preparados de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

Los dAb-grupos efectores de la presente invención pueden combinarse sobre estructuras multiligando que no son de inmunoglobulina de modo que forman estructuras multivalentes que comprenden más de un sitio de unión a antígeno. Dichas estructuras tienen una mayor avidéz de unión a antígeno. En un ejemplo de dichos multímeros, las regiones V se unen a epítopes diferentes en el mismo antígeno proporcionando una avidéz superior. En otra realización, pueden construirse complejos multivalentes en proteínas de armazón como se describe en el documento WO0069907 (Medical Research Council), que están basados, por ejemplo, en la estructura de anillo de GroEL bacteriano o en otros polipéptidos de chaperona.

Como alternativa, los dAb-grupos efectores de acuerdo con la presente invención pueden combinarse en ausencia de un armazón proteico que no es de inmunoglobulina para formar estructuras multivalentes que están basadas únicamente en dominios de inmunoglobulina. Dichas estructuras multivalentes pueden tener mayor avidéz hacia moléculas diana gracias a que comprenden múltiples sitios de unión a epítope. Dichas estructuras multivalentes pueden ser homodímeros, heterodímeros o multímeros.

Los presentes inventores consideran que los dAb-grupos efectores de la invención, así como dichas estructuras multivalentes, serán de utilidad particular para su uso en usos profilácticos y/o terapéuticos.

Los antígenos pueden ser, o formar parte de, polipéptidos, proteínas o ácidos nucleicos, que pueden ser de origen natural o sintético. Un experto en la materia apreciará que la elección es grande y variada. Por ejemplo, pueden ser proteínas humanas o animales, citocinas, receptores de citocinas, cofactores enzimáticos para enzimas o proteínas de unión a ADN. Las citocinas adecuadas y factores de crecimiento incluyen, pero sin limitación: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, EpoR, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos-10, ligando de FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- $\beta$ 1, insulina, IL1R1, IFN- $\gamma$ , IGF-I, IGF-II, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 aminoácidos), IL-8 (77 aminoácidos), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina  $\alpha$ , Inhibina

$\beta$ , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora Mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteínas atrayentes de monocitos (30 *ibid*), M-CSF, MDC (67 aminoácidos), MDC (69 aminoácidos), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 aminoácidos), MDC (69 aminoácidos), MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$ , MIP-4, factor inhibidor de progenitor mielóide-1 (MPIF-1),  
 5 NAP-2, Neurturina, factor de crecimiento nervioso,  $\beta$ -NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, p55, sitio de reconocimiento de TNF $\alpha$ , pro-TNF- $\alpha$ -tallo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 $\alpha$ , SDF1 $\beta$ , SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, sitio de reconocimiento de enzima TACE, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  TGF $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , receptor de TNF I, receptor de TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, receptor 3 de VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$ , HCC1, 1-309,  
 10 HER 1, HER 2, HER 3 y HER 4. Los receptores de citocinas incluyen receptores para las citocinas anteriores. Se apreciará que esta lista no pretende ser exhaustiva.

En una realización de la invención, los dominios variables proceden de un anticuerpo dirigido contra uno o más antígenos o epítopes. A este respecto, el dAb-grupo efector de la invención puede unirse al (a los) epítopo(s) o antígeno(s)  
 15 y actuar como antagonista o agonista (por ejemplo, agonista de receptor de EPO).

En una realización preferida, los dominios variables proceden de un repertorio de dominios de anticuerpo variable sencillo. En un ejemplo, el repertorio es un repertorio que no se genera en un animal o un repertorio sintético. En otro ejemplo, los dominios variables sencillos no se aíslan (al menos en parte) por inmunización de animales. Por lo tanto,  
 20 los dominios sencillos pueden aislarse a partir de una biblioteca sin tratamiento previo.

En un aspecto, se construye una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de fago o fagémido o usando tecnología de emulsión como se describe en el documento WO 99/02671) en la que una población de miembros de biblioteca comprenden cada uno una construcción común que codifica un grupo efector (por ejemplo, una región Fc). Después se  
 25 cortan y empalman una diversidad de secuencias que codifican dominios variables sencillos para formar una biblioteca de miembros que presentan una diversidad de dominios variables sencillos en el contexto del mismo grupo efector. Después se efectúa la selección de dAb-grupo efector frente a un antígeno o epítopo en el contexto del grupo efector común, que puede haberse seleccionado, por ejemplo, en base a sus efectos deseables sobre la semivida.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona uno o más moléculas de ácido nucleico que codifican al menos un dAb-grupo efector como se define en el presente documento.

El dAb-grupo efector puede estar codificado en una sola molécula de ácido nucleico; como alternativa, diferentes partes de la molécula pueden estar codificadas por moléculas de ácido nucleico separadas. Cuando el “dAb-grupo efector” está codificado por una sola molécula de ácido nucleico, los dominios pueden expresarse como un polipéptido de fusión o pueden expresarse por separado y posteriormente unirse entre sí, por ejemplo, usando agentes de engarce químicos. Los dAb-grupos efectores expresados a partir de ácidos nucleicos separados se unirán entre sí por medios apropiados.

El ácido nucleico puede codificar además una secuencia señal para la exportación de los polipéptidos desde una célula huésped tras su expresión y puede fusionarse con un componente de superficie (por ejemplo, al menos parte de la proteína de cubierta pIII) de una partícula de bacteriófago filamentoso (u otro componente de un sistema de presentación de selección) tras su expresión.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una célula huésped transfectada con un vector de acuerdo con la presente invención.

La expresión a partir de dicho vector puede configurarse para producir, por ejemplo, en la superficie de una partícula de bacteriófago, dAb-grupos efectores para su selección.

El dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse en forma de un kit adecuado para la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición que comprende un dAb-grupo efector de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se ha analizado anteriormente, los presentes inventores han descubierto que el tamaño y la naturaleza del grupo efector aumentan la semivida de un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la materia estarán familiarizados con los procedimientos para el análisis farmacocinético. Pueden encontrarse detalles en Kenneth, A y col: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters y col, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a “Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2nd Rev. ex edition (1982), que describe parámetros farmacocinéticos tales como las semividas t alfa y t beta y el área bajo la curva (ABC).

Las semividas  $t_{1/2}$  alfa y  $t_{1/2}$  beta) y el ABC pueden determinarse a partir de una curva de la concentración en suero de dAb-grupo efector frente al tiempo (véase, por ejemplo, la figura 6). Puede usarse el paquete de análisis WinNonlin (disponible de Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, Estados Unidos), por ejemplo, para modelar la curva. En una primera fase (la fase alfa), el dAb-grupo efector está experimentando principalmente distribución en el paciente, con cierta eliminación. Una segunda fase (fase beta) es la fase terminal cuando el dAb-grupo efector se ha distribuido y la concentración en suero está disminuyendo a medida que se elimina el dAb-grupo efector del paciente. La semivida  $t_{1/2}$  alfa es la semivida de la primera fase y la semivida  $t_{1/2}$  beta es la semivida de la segunda fase.

Por lo tanto, ventajosamente, la presente invención proporciona un dAb-grupo efector o una composición que comprende un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención que tiene una semivida  $t_{1/2}$  en el intervalo de 15 minutos o más. Una realización, el extremo inferior del intervalo es de 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o como alternativa, un dAb-grupo efector o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida  $t_{1/2}$  en el intervalo de hasta 12 horas inclusive. En una realización, el extremo superior del intervalo es de 11, 10, 9, 8, 7, 6 ó 5 horas. Un ejemplo de un intervalo adecuado es de 1 a 6 horas, de 2 a 5 horas o de 3 a 4 horas.

Ventajosamente, la presente invención proporciona un dAb-grupo efector o una composición que comprende un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención que tiene una semivida  $t_{1/2}$  en el intervalo de 2,5 horas o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es de 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o como alternativa, un dAb-grupo efector o composición de acuerdo con la invención tiene una semivida  $t_{1/2}$  en el intervalo de hasta 21 días inclusive. En una realización, un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención tiene una semivida  $t_{1/2}$  de cualquiera de las semividas  $t_{1/2}$  seleccionadas del grupo constituido por las siguientes: 12 horas o más, 24 horas o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 7 días o más, 8 días o más, 9 días o más, 10 días o más, 11 días o más, 12 días o más, 13 días o más, 14 días o más, 15 días o más o 20 días o más. Ventajosamente, un dAb-grupo efector o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida  $t_{1/2}$  en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización adicional, tendrá una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más. En otra realización adicional, estará en el intervalo de 12 a 26 horas.

Ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención comprende o está constituido por una  $V_L$ -Fc que tiene una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más, dos días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 7 días o más. Más ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención comprende o está constituido por una  $V_L$ -Fc que tiene una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más.

De acuerdo con la presente invención, más ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención comprende un grupo efector constituido por los dominios de región constante CH2 y/o CH3, preferentemente CH2 y CH3, con o sin una región de bisagra como se describe en el presente documento, teniendo el dAb-grupo efector una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más, dos días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, o 7 días o más. Más ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención comprende un grupo efector constituido por los dominios de región constante CH2 y/o CH3, teniendo el dAb-grupo efector una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más.

Además, o como alternativa a los criterios anteriores, la presente invención proporciona un dAb-grupo efector o una composición que comprende un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención que tiene un valor de ABC (área bajo la curva) en el intervalo de 1 mg.min/ml o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es de 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 ó 300 mg.min/ml. Además, o como alternativa, un dAb-grupo efector o composición de acuerdo con la invención tiene un ABC en el intervalo de hasta 600 mg.min/ml. En una realización, el extremo superior del intervalo es de 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/ml. Ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención tendrá un ABC en el intervalo seleccionado del grupo constituido por lo siguiente: de 15 a 150 mg.min/ml, de 15 a 100 mg.min/ml, de 15 a 75 mg.min/ml y de 15 a 50 mg.min/ml.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un dAb-grupo efector o una composición de acuerdo con la presente invención en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención o una composición del mismo en el tratamiento de una enfermedad.

Además, los presentes inventores han descubierto que un dAb-Fc específico para la diana TNF alfa humano y denominado TARI-5-19-Fc demostró ser una terapia altamente eficaz en un modelo de artritis. Por lo tanto, los inventores consideran que un TARI-5-19-grupo efector puede ser de utilidad particular en la profilaxis y/o tratamiento de una o más enfermedades inflamatorias.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de una o más enfermedades inflamatorias.

De acuerdo con los aspectos anteriores de la invención, ventajosamente, el dAb-grupo efector se une específicamente a TNF alfa. Más ventajosamente, el dAb-grupo efector se une específicamente a TNF alfa humano. Aún más ventajosamente, el dAb-grupo efector es un dAb-Fc y se une específicamente a TNF alfa, preferentemente a TNF



alfa humano. Aún más ventajosamente, el dAb-grupo efector comprende TAR1-5-19 como grupo efector. Más ventajosamente, el dAb-grupo efector para su uso de acuerdo con los aspectos anteriores de la invención es TAR1-5-19-Fc.

De acuerdo con los aspectos anteriores de la invención, ventajosamente, dichas una o más enfermedades inflamatorias están mediadas por TNF-alfa. Ventajosamente, dichas una o más enfermedades inflamatorias están mediadas por TNF alfa y se seleccionan del grupo constituido por las siguientes: artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), esclerosis múltiple, choque séptico, Alzheimer, trombosis coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y nefritis glomerular.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para reducir y/o prevenir y/o suprimir la caquexia en un paciente.

En una realización preferida de los aspectos anteriores de la invención, la caquexia está asociada con una enfermedad inflamatoria. Ventajosamente, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo constituido por las siguientes: artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), esclerosis múltiple, choque séptico, Alzheimer, trombosis coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y nefritis glomerular.

De acuerdo con los aspectos anteriores de la invención, el uso puede usarse para el tratamiento de pacientes humanos o no humanos. De acuerdo con los aspectos anteriores de la invención, preferentemente, el paciente es un ser humano y el TNF alfa es TNF alfa humano.

Las dosificaciones adecuadas para la administración a un sujeto de un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención serán conocidas para los expertos en la materia. Ventajosamente, la dosis está en el intervalo de entre 0,5 y 20 mg/kg de dAb-grupo efector. Más ventajosamente, la dosificación de dAb-grupo efector está en el intervalo de entre 1 y 10 mg/kg. Los intervalos de dosificación preferidos están entre 1 y 5 mg/kg. Más ventajosamente, se administran dosificaciones de 1 mg/kg o 5 mg/kg de dAb-grupo efector. Los regímenes de dosificación adecuados pueden depender de ciertas características del sujeto incluyendo la edad, la gravedad de la enfermedad y similares. El dAb-grupo efector puede administrarse, por ejemplo, particularmente cuando el sujeto es un ser humano, diariamente, una vez por semana, dos veces por semana o una vez al mes. Los expertos en la materia apreciarán que esta lista no pretende ser exhaustiva.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra diversos dAb-grupos efectores preferidos de acuerdo con la presente invención.

(a) muestra  $V_L$  unida a la región de bisagra de una molécula de anticuerpo.

(b) muestra  $V_L$  unida a CH1 o CH2 o CH3.

(c) muestra  $V_L$  y  $V_L$  o  $V_H$  y unida a CH y CH2 o CH3

(d) muestra un dAB-grupo efector de acuerdo con (b) unido a  $V_H$  o  $V_L$

(e) muestra un dímero de  $V_L$  y  $V_L$  o  $V_H$  unido a cualquier combinación de dominios CH1/CH2 y CH3, en el que los dominios variables están unidos entre sí, con o sin el uso de un engarce como se describe en el presente documento

(f) muestra un dímero que tiene los mismos componentes que la etapa (e) pero en el que el punto de unión entre los dos componentes que componen el dímero es los grupos efectores

(g) muestra  $V_L$  unida a la región Fc de una molécula de anticuerpo.

\* Los dominios variables sencillos  $V_H$  y  $V_L$  forman cada uno un sitio de unión a antígeno o epítipo respectivo y la especificidad de antígeno o epítipo de los dominios variables sencillos es diferente.

La Figura 2 muestra el vector plgplus señal usado para generar fusiones E5-Fc y VH2-Fc. Se proporcionan detalles en el Ejemplo 1.

La Figura 3a muestra geles de SDS-PAGE que representan la purificación de grupos efectores de inmunoglobulina de acuerdo con la invención; Carril 1-marcador de PM (kDa), Carril 2-medio de Cultivo antes de la purificación de Proteína A, Carril 3-medio de Cultivo después de la purificación de Proteína A, Carril 4-Proteína E5-Fc purificada, Carril 5-Proteína E5-Fc purificada. La Figura 3b muestra la glicosilación de inmunoglobulina-grupos efectores de acuerdo con la invención. Los carriles están marcados en la Figura. La Figura 3c muestra los resultados del ELISA que demuestran que las células Cos-1, células Cos-7 y las células CHO son capaces de expresar proteínas de fusión dAb-Fc de la especificidad correcta y sin reactividad cruzada con antígenos irrelevantes.

## ES 2 346 431 T3

La Figura 4 muestra que la proteína de fusión E5-Fc es capaz de unirse a la línea celular que expresa receptores de Fc humanos. La proteína E5-Fc purificada se marcó con fluoresceína a una proporción de 3,3/1 de Fluo/Proteína. La proteína marcada (concentración de 491  $\mu\text{g/ml}$ ) se usó después para análisis de FACS. Se usaron células tipo monocito humano U937 que expresan dos tipos de FcR humanos (CD 64 y CD32) para evaluar la capacidad de la proteína de fusión E5-Fc para unirse a estos receptores. Los resultados del FACS indican que la proteína de fusión E5-Fc se une a la línea celular U937 (se incubaron  $5 \times 10^5$  células U-937 con 80 ml de la dilución 1:50 de la proteína marcada y se examinaron vivas).

- a. Figura 4a: células U-937 (control)
- b. Figura 4b: células U-937 incubadas con anticuerpo anti-CD64 (control positivo)
- c. Figura 4c: células U-937 incubadas con anticuerpo anti-CD32 (control positivo)
- d. Figura 4d: células U-937 incubadas con anticuerpo anti-CD16 (control negativo)
- e. Figura 4e: células U-937 incubadas con proteína de fusión E5-Fc

Figura 5: Se usaron células Raj 1 (que expresan solamente receptor CD32) para el análisis de FACS. Los resultados del FACS demuestran que la cadena E5-Fc se une a células Raj 1.

1. Células Raj 1 (control)
2. Células Raj 1 incubadas con anticuerpo anti-CD64 (control negativo)
3. Células Raj 1 incubadas con anticuerpo anti-CD32 (control positivo)
4. Células Raj 1 incubadas con anticuerpo anti-CD16 (control negativo)
5. Células Raj 1 incubadas con proteína de fusión E5-Fc

La Figura 6 muestra los resultados del Análisis Farmacocinético. La figura muestra los niveles en suero en ratones después de dosis IV en embolada de 50  $\mu\text{g}$  de HEL-4 o E5-Fc de acuerdo con la invención.

La Figura 7 muestra el efecto de inyecciones dos veces por semana de TAR1-5-19 sobre las puntuaciones artríticas de los ratones Tg197.

La Figura 8 muestra la puntuación histopatológica de las articulaciones del tobillo de los diferentes grupos de tratamiento.

La Figura 9 muestra el efecto de inyecciones dos veces por semana de TAR1-5-19 sobre los pesos promedios de grupo de ratones Tg197.

Figura 10: Secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión de dAb de factor alfa-Fc desde el inicio de la secuencia líder de factor alfa hasta el sitio de clonación EcoRI.

Figura 11: Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de dAb de factor alfa-Fc, codificada por la secuencia mostrada en la Figura 10.

Figura 12: Actividad de unión a antígeno: se determinó la actividad de unión a antígeno usando un ensayo de unión a receptor de TNF. Se revistió una placa Nunc Maxisorp de 96 pocillos con un anticuerpo de ratón anti-Fc humana, se bloqueó con BSA al 1% y después se añadió fusión de receptor de TNF 1-Fc. La proteína de fusión dAb-Fc a diversas concentraciones se mezcla con proteína TNF a 10 ng/ml y se incuba a temperatura ambiente durante > 1 hora. Esta mezcla se añade a las placas revestidas de proteína de fusión de receptor de TNF 1-Fc y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las placas se lavan para eliminar la fusión dAb-Fc libre no unida, el TNF y los complejos de dAb-Fc/TNF. Posteriormente, la placa se incubó secuencialmente con un anticuerpo anti-TNF biotinilado y peroxidasa de rábano picante-estreptavidina. Después, la placa se incubó con el sustrato de peroxidasa de rábano picante cromogénico TMB. Se interrumpió el desarrollo de color con la adición de ácido clorhídrico 1 M y se leyó la absorbancia a 450 nm. La lectura de absorbancia es proporcional a la cantidad de TNF unido, por lo tanto, la proteína de fusión TAR1-5-19Fc competirá con el receptor de TNF por la unión del TNF y reducirá la señal en el ensayo. La proteína producida por *P. pastoris* tenía una actividad equivalente a la proteína de mamífero en el ensayo de receptor de TNF *in vitro* descrito anteriormente.

La Figura 13 muestra un gel de SDS-PAGE no reductor al 15% que muestra una comparación entre la proteína de fusión TAR1-5-19Fc producida en células de mamífero (carriles 1 y 2) y *P. pastoris* (carril 3), purificada por afinidad por Proteína A. Puede observarse que las bandas principales presentes en los tres carriles son el homodímero unido por disulfuro a ~80 kDa y la unidad monomérica no unida por disulfuro a ~40 kDa. La filtración en gel de la proteína producida tanto por mamífero como por *P. Pastoris* indicó que en condiciones que no son de SDS-PAGE, ambas

especies se procesan como homodímeros. La banda minoritaria por debajo del marcador de 80 kDa representa la proteína Fc libre, sin dAb unido, producida por ataque proteolítico del polipéptido que une los dominios de dAb y Fc.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

**Immunoglobulina.** Se refiere a una familia de polipéptidos que conservan el plegamiento de inmunoglobulina característico de moléculas de anticuerpo, que contiene dos láminas  $\beta$  y, habitualmente, un enlace disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas están implicados en muchos aspectos de interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo papeles generalizados en el sistema inmune (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de células T y similares), e implicación en la adhesión celular (por ejemplo, las moléculas ICAM) y señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como el receptor de PDGF).

**Dominio.** Un dominio es una estructura proteica plegada que conserva su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de propiedades funcionales separadas de proteínas y, en muchos casos, pueden añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función. Por dominio variable de anticuerpo sencillo se entiende un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, en los que uno o más bucles se han sustituido por secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o que comprenden extensiones N- o C-terminales.

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

**Biblioteca.** El término biblioteca se refiere a una mezcla heterogénea de polipéptidos o ácidos nucleicos. La biblioteca está compuesta por miembros que tienen una secuencia de ácido nucleico o polipeptídica sencilla. En este sentido, *biblioteca* es sinónimo de *repertorio*. Las diferencias de secuencia entre miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede adoptar la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo, bacterias, virus, células animales o vegetales, y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferentemente, cada organismo o célula individual contiene sólo uno o un número limitado de miembros de la biblioteca. Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión para permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una biblioteca puede adoptar la forma de una población de organismos huésped, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un solo miembro de la biblioteca en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su miembro polipeptídico correspondiente. Por lo tanto, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un gran repertorio de variantes polipeptídicas genéricamente diversas.

**Un domino sencillo-grupo efector** (dAb-grupo efector), como se define en el presente documento, describe una estructura sintética obtenida por ingeniería genética que comprende un dominio variable sencillo capaz de unirse específicamente a uno o más epítopes, unido a uno o más dominios de región constante y/o bisagra (denominado en su conjunto "grupo efector"). El dominio variable es un dominio de cadena ligera ( $V_L$ ). En una realización, un grupo efector como se describe en el presente documento comprende una región Fc de un anticuerpo. Los dAb-grupos efectores pueden combinarse para formar estructuras multivalentes, mejorando de este modo la avidez de la interacción antigénica. Para evitar dudas, las moléculas de inmunoglobulina del dAb-grupo efector de acuerdo con la invención son moléculas de cadena sencilla, no son anticuerpos de doble cadena (por ejemplo, los descritos en el documento EP 0 656 946 A1). Además, la expresión "dAb-grupo efector" no incluye en su alcance los anticuerpos de doble cadena de origen natural generados en camélidos ni la estructura de cuatro cadenas de las moléculas de IgG. Los "dAb-grupos efectores" de acuerdo con la presente tienen una semivida que es de una longitud suficiente como para que pueden producir un efecto biológico *in vivo*. Los presentes inventores han descubierto que es el tamaño y la naturaleza del grupo efector la que determina las funciones efectoras del dAb-grupo efector como se define en el presente documento, así como la semivida *in vivo* de la molécula.

**Anticuerpo.** Un anticuerpo (por ejemplo IgG1, 2, 3 y 4; IgM; IgA; IgD; o IgE) o fragmento (tal como un Fab, Dab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fv unido por disulfuro, scFv, diacuerpo) derivado de cualquier especie que produce de forma natural un anticuerpo o generado por tecnología de ADN recombinante; aislado de suero, células B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias).

**TAR1-5-19** es un Dab que se une específicamente a la diana TNF alfa humana (TAR1).

**Antígeno** Un ligando que se une por un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención. Ventajosamente, pueden seleccionarse dominios sencillos de acuerdo con su especificidad de unión a antígeno para su uso en la presente invención. El antígeno puede ser un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula. En el caso de anticuerpos y fragmentos de los mismos, el sitio de unión a anticuerpo definido por los bucles variables (L1, L2, L3 y H1, H2, H3) es capaz de unirse al antígeno.

Un *epítope*, como se denomina en el presente documento, es una unidad de estructura unida convencionalmente por uno o más dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, un par  $V_H/V_L$  de inmunoglobulina. Los epítopes definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo y, por lo tanto, representan la diana de especificidad de un anticuerpo. En el caso de un anticuerpo de dominio sencillo, un epítope representa la unidad de estructura unida por un dominio variable aislada de otro dominio variable.

El término selección significa escoger entre varias alternativas diferentes. Los expertos en esa materia serán conscientes de los procedimientos de selección de uno o más dominios variables sencillos de anticuerpo. Ventajosamente, el procedimiento implica la selección a partir de una biblioteca. Ventajosamente, la biblioteca es una biblioteca de presentación en fagos.

*Región flanqueante universal.* Una secuencia de región flanqueante de anticuerpo sencilla correspondiente a las regiones de un anticuerpo conservado en secuencia como se define por Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services) o estructura como se define por Chothia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917. La invención proporciona el uso de una región flanqueante sencilla, o un conjunto de dichas regiones flanqueantes, que se ha descubierto que permite la modificación de prácticamente cualquier especificidad de unión por medio de variación en las regiones hipervariables solamente.

*Ligando genérico específico.* Un ligando que se une a todos los miembros de un repertorio. Generalmente, no se une por medio del sitio de unión a antígeno. Los ejemplos incluyen proteína A y proteína L.

Como se usa en el presente documento, la expresión "*origen humano*" significa que en algún punto en la modificación de una secuencia en cuestión, se usó una secuencia humana como fuente de secuencia de ácido nucleico. Se aplica un significado análogo al término "*origen de camélido*".

Como se usa en el presente documento, la expresión "*semivida aumentada*" significa que un dAb-grupo efector dado tiene una semivida en suero al menos un 25% más prolongada respecto al mismo dAb sin el efector. Son semividas aumentadas semividas preferentemente de al menos un 30% mayores, 40% mayores, 50% mayores, 75% mayores, 100% mayores, 3 veces mayores, 5 veces mayores, 10 veces mayores, 20 veces mayores, 50 veces mayores o más.

Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "*selección*" requiere la aplicación de una técnica o presión selectiva, permitiendo de este modo el aislamiento de uno o más artículos de entre una población basada en una o más características poseídas por el artículo o artículos seleccionados que no poseen los otros miembros de la población.

## Descripción detallada de la invención

### *Técnicas Generales*

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

### *Preparación de dAb-grupos efectores de acuerdo con la presente invención*

Pueden prepararse dAb-grupos efectores de acuerdo con técnicas previamente establecidas usadas en el campo de la ingeniería genética de anticuerpos para la preparación de scFv, anticuerpos de "fago" y otras moléculas de anticuerpo obtenidas por ingeniería genética. Se describen técnicas para la preparación de anticuerpos y, en particular, anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, en las revisiones siguientes y en las referencias citadas en las mismas: Winter y Milstein, (1991) Nature 349: 293-299; Plueckthun (1992) Immunological Reviews 130:151-188; Wright y col., (1992) Crit. Rev. Immunol. 12: 125-165; Holliger, P. y Winter, G. (1993) Curr. Op. Biotechn. 4, 446-449; Carter, y col. (1995) J. Hematother. 4, 463-470; Chester, K. A. y Hawkins, R. E. (1995) Trends Biotechn. 13, 294-300; Hoogenboom, H. R. (1997) Nature Biotechnol. 15, 125-126; Fearon, D. (1997) Nature Biotechnol. 15, 618-619; Plückthun, A. & Pack, P. (1997) Immunotechnology 3, 83-105; Carter, P. y Merchant, A. M. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8, 449-454; Holliger, P. y Winter, G. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45, 128-130.

Las técnicas empleadas para la selección de los dominios variables emplean bibliotecas y procedimientos de selección que son conocidos en la técnica. Las bibliotecas naturales (Marks y col. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581; Vaughan y col. (1996) Nature Biotech., 14: 309) que usan genes V reorganizados recogidos de células B humanas son bien conocidas por los expertos en la materia. Las bibliotecas sintéticas (Hoogenboom y Winter (1992) J. Moli. Biol., 227: 381; Barbas y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissim y col. (1994) EMBO J., 13: 692; Griffiths y col. (1994) EMBO J., 13: 3245; De Kruif y col. (1995) J. Mol. Biol., 248: 97) se preparan por clonación de genes V de inmunoglobulina, habitualmente usando PCR. Errores en el procedimiento de PCR pueden conducir a un alto grado

de aleatorización. Pueden seleccionarse bibliotecas de  $V_H$  y/o  $V_L$  contra antígenos o epítopes diana por separado, en cuyo caso se selecciona a favor de unión a dominio sencillo, o conjuntamente.

Un procedimiento preferido para sintetizar un “dAb-grupo efector” de acuerdo con la presente invención comprende el uso de un sistema de selección en el que se selecciona un repertorio de dominios variables para su unión a un antígeno o epítipo. Los dominios sencillos seleccionados se unen después a un grupo efector.

Los grupos efectores adecuados incluyen cualquiera de los seleccionados del grupo constituido por los siguientes: un grupo efector que comprende al menos una región constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), un dominio de cadena pesada CH1 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH3 de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos. Además de dichos uno o más dominios de región constante, un grupo efector también puede comprender una región de bisagra de un anticuerpo (tal como una región que se encuentra normalmente entre los dominios CH1 y CH2 de una molécula de IgG). De acuerdo con una realización alternativa de la invención, el “dAb-grupo efector” es un dominio variable sencillo unido a la región de bisagra derivada de una molécula de anticuerpo.

En una realización alternativa de este aspecto de la invención, el grupo efector se basa en un fragmento de anticuerpo Fab. Es decir, comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio  $V_L$  y opcionalmente un dominio  $V_H$  unido a uno o más dominios de región constante que constituyen un fragmento Fab. Un experto en la materia apreciará que dicho fragmento comprende sólo un dominio variable. Dichos grupos efectores Fab se ilustran en la Figura Ig. En la realización de cadena 2 mostrada en la Figura Ig (es decir, la realización de 2 cadenas), los dominios variables sencillos forman cada uno un sitio de unión a antígeno o epítipo respectivo. Por lo tanto, los dominios variables sencillos no forman conjuntamente un sitio de unión sencillo. La especificidad de antígeno o epítipo de los dominios variables es diferente.

En una realización preferida adicional de este aspecto de la invención, un grupo efector de acuerdo con la presente invención es una región Fc de una molécula de IgG.

#### A. Sistemas de vector de biblioteca

Se conocen en la técnica una diversidad de sistemas de selección que son adecuados para su uso en la presente invención. Se describen a continuación ejemplos de dichos sistemas.

Los sistemas de expresión en bacteriófago lambda pueden explorarse directamente como placas de bacteriófagos o como colonias de lisógenos, en ambos casos como se ha descrito anteriormente (Huse y col. (1989) Science, 246: 1275; Caton y Koprowski- (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87; Mullinax y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8095; Persson y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 2432) y son de utilidad en la invención. Aunque dichos sistemas de expresión pueden usarse para explorar hasta  $10^6$  miembros diferentes de una biblioteca, no son realmente adecuados para explorar mayores cantidades superiores a  $10^6$  miembros).

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

Se conocen en la técnica protocolos de selección para aislar miembros deseados de grandes bibliotecas, tipificados por técnicas de presentación en fago. Dichos sistemas, en los que se presentan diversas secuencias peptídicas en la superficie de bacteriófagos filamentosos (Scott y Smith (1990) Science, 249: 386) han resultado útiles para crear bibliotecas de fragmentos de anticuerpos (y las secuencias de nucleótidos que los codifican) para la selección *in vitro* y la amplificación de fragmentos de anticuerpos específicos que se unen a un antígeno diana (McCafferty y col., WO 92/01047). Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se unen a fragmentos génicos que codifican señales líder que los dirigen al espacio periplásmico de *E. coli* y, como resultado, los fragmentos de anticuerpo resultantes se presentan en la superficie del bacteriófago, típicamente como fusiones con proteínas de la cubierta del bacteriófago (por ejemplo, pIII o pVIII). Como alternativa, los fragmentos de anticuerpo se presentan externamente en cápsides de fago lambda (fagocuerpos). Una ventaja de los sistemas de presentación basados en fagos es que, debido a que son sistemas biológicos, pueden amplificarse miembros de bibliotecas seleccionados simplemente cultivando el fago que contiene el miembro de biblioteca seleccionado en células bacterianas. Además, puesto que la secuencia de nucleótidos que codifica el miembro de biblioteca polipeptídica está contenida en un fago o vector fagémido, la secuenciación, expresión y posterior manipulación genética es relativamente sencilla.

Los procedimientos para la construcción de bibliotecas de presentación de anticuerpos en bacteriófagos y bibliotecas de expresión en fago lambda son bien conocidos en la técnica (McCafferty y col. (1990) Nature, 348: 552; Kang y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 4363; Clackson y col. (1991) Nature, 352: 624; Lowman y col. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Burton y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 10134; Hoogenboom y col. (1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133; Chang y col. (1991) J. Immunol., 147: 3610; Breitling y col. (1991) Gene, 104: 147; Marks y col. (1991) mencionado anteriormente; Barbas y col. (1992) mencionado anteriormente; Hawkins y Winter (1992) J. Immunol., 22: 867; Marks y col., 1992, J. Biol. Chem., 267: 16007; Lerner y col. (1992) Science, 258: 1313, incorporados en el presente documento por referencia).

- Una estrategia particularmente ventajosa ha sido el uso de bibliotecas de fago de scFv (Huston y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 85: 5879-5883; Chaudhary y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 87: 1066-1070; McCafferty y col. (1990) mencionado anteriormente; Clackson y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks y col. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581; Chiswell y col. (1992) Trends Biotech., 10: 80; Marks y col. (1992) J. Biol. Chem., 267). Se han descrito diversas realizaciones de bibliotecas de scFv presentadas en proteínas de cubierta de bacteriófagos. También se conocen refinamientos de las estrategias de presentación en fagos, por ejemplo, como se describe en los documentos WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council y col.) y WO97/08320 (Morphosys), que se incorporan en el presente documento por referencia.
- Otros sistemas para generar bibliotecas de polipéptidos implican el uso de maquinaria enzimática sin células para la síntesis *in vitro* de los miembros de la biblioteca. En un procedimiento, se seleccionan moléculas de ARN por rondas alternas de selección frente a un ligando diana y amplificación por PCR (Tuerk y Gold (1990) Science, 249: 505; Ellington y Szostak (1990) Nature, 346: 818). Puede usarse una técnica similar para identificar secuencias de ADN que se unen a un factor de transcripción humano predeterminado (Thiesen y Bach (1990) Nucleic Acids Res., 18: 3203; Beaudry y Joyce (1992) Science, 257: 635; documentos WO92/05258 y WO92/14843). De una forma similar, puede usarse traducción *in vitro* para sintetizar polipéptidos como un procedimiento para generar grandes bibliotecas. Estos procedimientos que comprenden generalmente complejos de polisoma estabilizados se describen adicionalmente en los documentos WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058 y WO92/02536. Sistemas de presentación alternativos que no están basados en fagos, tales como los desvelados en los documentos WO95/22625 y WO95/11922 (Affymax) usan los polisomas para presentar polipéptidos para su selección.

Una categoría adicional más de técnicas implica la selección de repertorios en compartimentos artificiales, lo cual permite la conexión de un gen con su producto génico. Por ejemplo, en los documentos WO99/02671, WO00/40712 y Tawfik y Griffiths (1998) Nature Biotechnol 16(7), 652-6 se describe un sistema de selección en el que pueden seleccionarse ácidos nucleicos que codifican productos génicos deseables en microcápsulas formadas por emulsiones de agua en aceite. Los elementos genéticos que codifican un producto génico que tiene una actividad deseada se compartimentalizan en microcápsulas y después se transcriben y/o traducen para producir su productos génicos respectivos (ARN o proteína) dentro de las microcápsulas. Posteriormente se clasifican los elementos genéticos que producen producto génico que tiene la actividad deseada. Esta estrategia selecciona productos génicos de interés por detección de la actividad deseada mediante una diversidad de medios.

#### B. Construcción de Biblioteca

Pueden construirse bibliotecas destinadas al uso en selección usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se ha expuesto anteriormente, o pueden adquirirse en fuentes comerciales. Se describen bibliotecas que son útiles en la presente invención, por ejemplo, en el documento WO99/20749. Una vez que se escoge un sistema de vector y que una o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de interés se clonan en el vector de biblioteca, se puede generar una diversidad dentro de las moléculas clonadas sometiendo a mutagénesis antes de la expresión; como alternativa, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse, como se ha descrito anteriormente, antes de la mutagénesis y se realizan rondas adicionales de selección. La mutagénesis de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos estructuralmente optimizados se lleva a cabo por procedimientos moleculares convencionales. Es de utilidad particular la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, (Mullis y Faloona (1987) Methods Enzymol., 155: 335, incorporada en el presente documento por referencia). La PCR, que usa múltiples ciclos de replicación de ADN catalizada por una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable para amplificar la secuencia diana de interés, es bien conocida en la técnica. La construcción de diversas bibliotecas de anticuerpos se ha analizado en Winter y col. (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55, y referencias citadas en la misma.

Se realiza PCR usando ADN de molde (al menos 1fg; más provechosamente 1-1000 ng) y al menos 25 pmol de cebadores oligonucleotídicos. Puede ser ventajoso usar una mayor cantidad de cebador cuando la combinación de cebador es enormemente heterogénea, ya que cada secuencia está representada por sólo una pequeña fracción de las moléculas de la combinación y las cantidades se vuelven limitantes en los ciclos de amplificación posteriores. Una mezcla de reacción típica incluye: 2 µl de ADN, 25 pmol de cebador oligonucleotídico, 2,5 µl de tampón de PCR 1 10X (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4 µl de dNTP 1,25 µM, 0,15 µl (o 2,5 unidades) de ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada hasta un volumen total de 25 µl. Se cubre con una capa de aceite mineral y la PCR se realiza usando un termociclador programable. La longitud y la temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajustan de acuerdo con los requisitos de rigurosidad efectivos. La temperatura de hibridación y el ajuste del tiempo se determinan tanto por la eficacia con la que se espera que un cebador hibride con un molde como por el grado de emparejamiento erróneo que se va a tolerar; obviamente, cuando las moléculas de ácido nucleico se amplifican y mutan simultáneamente, es necesario el emparejamiento erróneo, al menos en la primera ronda de síntesis. La capacidad para optimizar la rigurosidad de las condiciones de hibridación de cebadores está bien dentro del conocimiento de un experto moderado en la materia. Se usa una temperatura de hibridación de entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas de molde se produce normalmente entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguida de 20-40 ciclos constituidos por desnaturalización (94-99°C durante 15 segundos a 1 minuto), hibridación (temperatura determinada como se ha analizado anteriormente; 1-2 minutos) y extensión (72°C durante 1-5 minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado). La extensión final es generalmente durante 4 minutos a 72°C y puede seguirse de una etapa indefinida (0-24 horas) a 4°C.

*C. Unión de dominios variables sencillos a grupos efectores de acuerdo con la presente invención*

Los dominios de acuerdo con la invención, una vez seleccionados, pueden unirse a grupos efectores como se describe en el presente documento por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo procedimientos covalentes y no covalentes.

Los procedimientos preferidos incluyen el uso de engarces polipeptídicos, como se describen, por ejemplo, en relación con las moléculas scFv (Bird y col., (1988) Science 242:423-426). Los engarces pueden ser flexibles, permitiendo que interaccionen los dos dominios sencillos. También pueden emplearse engarces usados en diacuerpos, que son menos flexibles (Holliger y col., (1993) PNAS (USA) 90: 6444-6448).

Los dominios variables pueden unirse a grupos efectores usando procedimientos distintos de engarces. Por ejemplo, puede aprovecharse el uso de puentes disulfuro, proporcionados por medio de restos de cisteína de origen natural u obtenidos por ingeniería genética.

Cuando sea apropiado, pueden emplearse otras técnicas para unir dominios variables de inmunoglobulinas a grupos efectores de la presente invención.

La longitud y la naturaleza del engarce pueden afectar a las características físicas de la molécula de dAb-efector. Por ejemplo, los engarces pueden facilitar la asociación de los dominios, tal como por incorporación de restos aminoácidos pequeños en localizaciones oportunas. Como alternativa, puede diseñarse una estructura rígida adecuada que mantenga al grupo efector y al dominio variable en estrecha proximidad física entre sí.

*D. "dAb-grupos efectores" de acuerdo con la presente invención*

De acuerdo con la presente invención, se unen dominios variables  $V_L$  sencillos a un grupo efector por medios descritos en el presente documento.

*(a) Preparación de un dAb-grupo efector de la presente invención*

Un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención pueden proceder de cualquier especie que produzca de forma natural un anticuerpo, o crearse por tecnología de ADN recombinante; se aísla de suero, células B, hibridomas, transfectomas, levaduras o bacterias.

El dominio variable sencillo y el grupo efector de acuerdo con la presente invención pueden estar en la misma cadena polipeptídica. Como alternativa, pueden estar en cadenas polipeptídicas separadas. En el caso de que estén en la misma cadena polipeptídica pueden unirse por un engarce. Preferentemente, el engarce es una secuencia peptídica, como se ha descrito anteriormente.

El dominio variable sencillo y el grupo efector pueden asociarse covalentemente o no covalentemente. En el caso de que se asocien covalentemente, los enlaces covalentes pueden ser enlaces disulfuro.

En el caso de que los dominios variables se seleccionen de repertorios de genes V seleccionados, por ejemplo, usando tecnología de presentación en fagos como se describe en el presente documento, entonces estos dominios variables comprenden una región flanqueante universal, de modo que pueden reconocerse por un ligando genérico específico como se define en el presente documento. El uso de regiones flanqueantes universales, ligandos genéricos y similares se describe en el documento WO99/20749. Los ejemplos de segmentos génicos de la línea germinal preferidos para la preparación de dAB-grupos efectores de acuerdo con la invención incluyen cualquiera de los seleccionados del grupo constituido por los siguientes: DP38, DP45, DP47 y DPK9.

Cuando se usan repertorios de genes V, la variación en la secuencia polipeptídica se localiza preferentemente dentro de los bucles estructurales de los dominios variables. Las secuencias polipeptídicas de cualquier dominio variable pueden modificarse por reordenamiento de cadenas de ADN o por mutación para mejorar la interacción de cada dominio variable con su epítipo complementario.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica al menos un anticuerpo de dominio sencillo-grupo efector como se define en el presente documento.

Las regiones variables pueden proceder de anticuerpos dirigidos contra antígenos o epítipes diana. Como alternativa, pueden proceder de un repertorio de dominios de anticuerpo sencillos tales como los expresados en la superficie de bacteriófagos filamentosos. La selección puede realizarse como se describe a continuación.

En general, las moléculas de ácido nucleico y construcciones de vector necesarias para la realización de la presente invención pueden construirse y manipularse como se expone en manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Estados Unidos.

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

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un dominio sencillo-grupo efector como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un vector se refiere a un elemento discreto que se usa para introducir ADN heterólogo en células para su expresión y/o replicación. Los procedimientos mediante los que se seleccionan o construyen y posteriormente se usan dichos vectores son bien conocidos para un experto habitual en la materia. Numerosos vectores están disponibles públicamente, incluyendo plásmidos bacterianos, bacteriófagos, cromosomas artificiales y vectores episomales. Dichos vectores pueden usarse para clonación simple y mutagénesis; como alternativa, se emplea un vector de expresión génica. Un vector de uso de acuerdo con la invención puede seleccionarse para alojar una secuencia codificante de polipéptido de un tamaño deseado, típicamente de 0,25 kilobases (kb) a 40 kilobases o más de longitud. Una célula huésped adecuada se transforma con el vector después de manipulaciones de clonación *in vitro*. Cada vector contiene diversos componentes funcionales, que incluyen generalmente un sitio de clonación (o “poliengarse”), un origen de replicación y al menos un gen marcador de selección. Si un vector dado es un vector de expresión, posee además uno o más de los siguientes: un elemento potenciador, un promotor, y secuencias señal y de terminación de la transcripción, cada una situada cerca del sitio de clonación, de modo que se unen operativamente al gen que codifica un miembro del repertorio de polipéptidos de acuerdo con la invención.

Los vectores tanto de clonación como de expresión contienen generalmente secuencias de ácido nucleico que permiten que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Típicamente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias replicantes de forma autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen plasmídico de 2 micrómetros es adecuado para levaduras y diversos orígenes virales (por ejemplo, SV 40, adenovirus) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero a menos que se usen en células de mamífero capaces de replicar altos niveles de ADN, tales como células COS.

Ventajosamente, un vector de clonación o expresión puede contener un gen de selección también denominado marcador de selección. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección, por lo tanto, no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos no disponibles en los medios de cultivo.

Puesto que la replicación de vectores de acuerdo con la presente invención se realiza más convenientemente en *E. coli*, es de utilidad un marcador de selección en *E. coli*, por ejemplo, el gen de la  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Éstos pueden obtenerse de plásmidos de *E. coli*, tales como pBR322 o un plásmido pUC tal como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente a la secuencia codificante de interés. Dicho promotor puede ser inducible o constitutivo. La expresión “unido operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que permite que funcionen de la forma deseada. Una secuencia de control “unida operativamente” a una secuencia codificante se liga de tal modo que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, los sistemas promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac. Los promotores para uso en sistemas bacterianos contendrán también generalmente una secuencia de Shine-Dalgarno unida operativamente a la secuencia codificante.

Los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos que corresponde a un miembro de la biblioteca de polipéptidos. Por lo tanto, la selección con el primer y/o segundo antígeno o epítope puede realizarse por propagación y expresión separada de un solo clon que exprese el miembro de la biblioteca de polipéptidos o mediante el uso de cualquier sistema de presentación de selección. Como se ha descrito anteriormente, el sistema de presentación de selección preferido es la presentación en bacteriófagos. Por lo tanto, pueden usarse vectores de fago o fagémido. Los vectores preferidos son vectores de fagémido que tienen un origen de replicación de *E. coli* (para replicación de doble cadena) y también un origen de replicación de fago (para la producción de ADN monocatenario. La manipulación y expresión de dichos vectores es bien conocida en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) mencionado anteriormente; Nissim y col. (1994) mencionado anteriormente). En resumen, el vector contiene un gen de  $\beta$ -lactamasa para conferir selectividad al fagémido y un promotor lac cadena arriba de un casete de expresión que está constituido (desde el extremo N a C-terminal) por una secuencia líder de pelB (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplásmico), un sitio de clonación múltiple (para clonar la versión de nucleótidos del miembro de la biblioteca), opcionalmente, uno o más marcadores peptídicos (para su detección), opcionalmente uno o más codones de terminación TAG y la proteína de fago pIII. Por lo tanto, usando diversas cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, isopropil tio- $\beta$ -D-galactósido (IPTG) o un fago auxiliar, tal como VCS M 13, el vector es capaz de replicarse como un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades del miembro



de la biblioteca de polipéptidos solamente o producir fagos, algunos de los cuales contienen al menos una copia de la fusión de polipéptido-pIII en su superficie.

La construcción de vectores de acuerdo con la invención emplea técnicas de ligación convencionales. Los vectores aislados o fragmentos de ADN se escinden, adaptan y religan de la forma deseada para generar el vector necesario. Si se desea, puede realizarse un análisis para confirmar que las secuencias correctas están presentes en el vector construido de una forma conocida. Los procedimientos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcritos *in vitro*, introducir ADN en células huésped y realizar análisis para evaluar la expresión y función son bien conocidos por los expertos en la materia. La presencia de una secuencia génica en una muestra se detecta, o su amplificación y/o expresión se cuantifica, por procedimientos convencionales tales como análisis de Southern o Northern, transferencia de Western, transferencia puntual de ADN, ARN o proteína, hibridación *in situ*, inmunocitoquímica o análisis de secuencia de moléculas de ácido nucleico o proteína. Los expertos en la materia imaginarán fácilmente cómo pueden modificarse estos procedimientos, si se desea.

#### (b) Estructura de dAb-grupos efectores de acuerdo con la invención

Un anticuerpo de dominio sencillo-grupo efector (dAb-grupo efector) como se define en el presente documento describe una molécula de anticuerpo obtenida por ingeniería genética que comprende un dominio variable sencillo capaz de unirse específicamente a uno o más epítopes, unido a uno o más dominios de región constante (grupos efectores). El dominio variable es un dominio de cadena ligera ( $V_L$ ).

Los grupos efectores adecuados incluyen cualquiera de los seleccionados del grupo constituido por los siguientes: un grupo efector que comprende al menos una región constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), un dominio de cadena pesada CH1 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH3 de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos. Además de dichos uno o más dominios de región constante, un grupo efector también puede comprender una región de bisagra de un anticuerpo (encontrándose típicamente dicha región entre los dominios CH1 y CH2 de una molécula de IgG). Ventajosamente, un grupo efector como se describe en el presente documento comprende una región Fc de un anticuerpo. Más ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención es un  $V_L$ -Fc.

En una realización alternativa de este aspecto de la invención, el grupo efector se basa en un fragmento de anticuerpo Fab. Es decir, comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio  $V_L$  unido a los dominios de región constante que componen un fragmento Fab. Un experto en la materia apreciará que dicho fragmento comprende un solo dominio variable.

En una realización, un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención, tiene una semivida  $t_{1/2}$  de cualquiera de las semividas  $t_{1/2}$  seleccionadas del grupo constituido por las siguientes: 12 horas o más, 24 horas o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 7 días o más, 8 días o más, 9 días o más, 10 días o más, 11 días o más, 12 días o más, 13 días o más, 14 días o más, 15 días o más o 20 días o más. Ventajosamente, un dAb-grupo efector o composición de acuerdo con la invención tendrá una semivida  $t_{1/2}$  en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización adicional, tendrá una semivida  $t$  de 1 día o más. En otra realización adicional, estará en el intervalo de 12 a 26 horas.

Ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención comprende o está constituido por un  $V_L$ -Fc que tienen una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más, dos días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más o 7 días o más. Más ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención comprende o está constituido por un  $V_L$ -Fc que tiene una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más.

De acuerdo con la presente invención, ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la invención comprende un grupo efector constituido por los dominios de región constante CH2 y/o CH3, preferentemente CH2 y CH3, con o sin una región de bisagra como se describe en el presente documento, teniendo el dAb-grupo efector una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más, dos días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más o 7 días o más. Más ventajosamente, un dAb-grupo efector de acuerdo con la presente invención comprende un grupo efector constituido por los dominios de región constante CH2 y/o CH3, teniendo el dAb-grupo efector una semivida  $t_{1/2}$  de un día o más.

#### Armazones de inmunoglobulina

Cada dominio variable sencillo comprende un armazón de inmunoglobulina y una o más CDR que están implicadas en la interacción específica del dominio con uno o más epítopes.

##### i. Selección de la conformación de la cadena principal

Todos los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas comparten un plegamiento similar para su cadena polipeptídica. Por ejemplo, aunque los anticuerpos son muy diversos en términos de su secuencia primaria, la comparación de secuencias y estructuras cristalográficas ha puesto de manifiesto que, al contrario de lo esperado, cinco de los seis bucles de unión a antígeno de los anticuerpos (H1, H2, L1, L2, L3) adoptan un número limitado de conformaciones de cadena principal o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196: 901; Chothia y col. (1989) Nature, 342: 877). El análisis de las longitudes de bucle y restos clave ha permitido, por lo tanto, la predicción

de las conformaciones de cadena principal de H1, H2, L1, L2 y L3 que se encuentran en la mayoría de anticuerpos humanos (Chothia y col. (1992) J. Mol. Biol., 227: 799; Tomlinson y col. (1995) EMBO J., 14: 4628; Williams y col. (1996) J. Mol. Biol., 264: 220). Aunque la región H3 es mucho más diversa en términos de secuencia, longitud y estructura (debido al uso de segmentos D), también forma un número limitado de conformaciones de cadena principal para longitudes de bucle cortas que depende de la longitud y de la presencia de restos particulares, o de los tipos de resto, en posiciones clave en el bucle y la región flanqueante del anticuerpo (Martin y col. (1996) J. Mol. Biol., 263: 800; Shirai y col. (1996) FEBS Letters, 399: 1).

Los dAb-grupos efectores de la presente invención se ensamblan ventajosamente a partir de bibliotecas de dominios, tales como bibliotecas de dominios  $V_L$ . Para su uso en la presente invención, se diseñan bibliotecas de polipéptidos de anticuerpos en las que se han seleccionado ciertas longitudes de bucle y restos clave para asegurar que se conoce la conformación de cadena principal de los miembros. Ventajosamente, éstas son conformaciones reales de moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se encuentran en la naturaleza para minimizar las posibilidades de que no sean funcionales. Los segmentos génicos V de la línea germinal sirven como una región flanqueante básica adecuada para construir bibliotecas de anticuerpos o receptores de células T; también son de utilidad otras secuencias. Pueden aparecer variaciones a una baja frecuencia, de tal manera que un pequeño número de miembros funcionales pueden poseer una conformación de cadena principal alterada que no afecte a su función.

La teoría de la estructura canónica también es de utilidad en la invención para evaluar el número de conformaciones de cadena principal diferentes codificadas por anticuerpos, para predecir la conformación de cadena principal basándose en las secuencias de anticuerpos y para escoger restos para su diversificación que no afecten a la estructura canónica. Se sabe que en el dominio  $V_k$  humano, el bucle L1 puede adoptar una de cuatro estructuras canónicas, el bucle L2 tiene una sola estructura canónica y que el 90% de los dominios  $V_k$  humanos adoptan una de cuatro o cinco estructuras canónicas para el bucle L3 (Tomlinson y col. (1995) mencionado anteriormente); por lo tanto, en el dominio  $V_k$  solamente, pueden combinarse diferentes estructuras canónicas para crear una serie de conformaciones de cadena principal diferentes. Dado que el dominio  $V_L$  codifica una serie diferente de estructuras canónicas para los bucles L1, L2 y L3 y que los dominios  $V_k$  y  $V_L$  pueden emparejarse con cualquier dominio  $V_H$  que puede codificar varias estructuras canónicas para los bucles H1 y H2, el número de combinaciones de estructura canónica observado para estos cinco bucles es muy grande. Esto implica que la generación de diversidad en la conformación de cadena principal puede ser esencial para la producción de una amplia serie de especificidades de unión. Sin embargo, mediante la construcción de una biblioteca de anticuerpos basada en una sola conformación de cadena principal conocida se ha descubierto, al contrario de lo esperado, que la diversidad en la conformación de la cadena principal no es necesaria para generar una diversidad suficiente para dirigirse a sustancialmente todos los antígenos. Aún más sorprendentemente, la conformación de cadena principal única no tiene que ser una estructura de consenso - puede usarse una conformación de origen natural única como base para una biblioteca completa. Por lo tanto, en un aspecto preferido, los dAB-grupos efectores de la invención poseen una sola conformación de cadena principal conocida.

La conformación de cadena principal única que se escoge es preferentemente común entre moléculas del tipo de la superfamilia de las inmunoglobulinas en cuestión. Una conformación es común cuando se observa que un número significativo de moléculas de origen natural la adoptan. Por consiguiente, en un aspecto preferido de la invención, se considera por separado la aparición natural de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada bucle de unión de una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas y después se escoge una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas de origen natural que posea la combinación deseada de conformaciones de cadena principal para los diferentes bucles. Si no está disponible ninguna, puede escogerse el equivalente más próximo. Es preferible que la combinación deseada de conformaciones de cadena principal para los diferentes bucles se cree por selección de segmentos génicos de la línea germinal que codifiquen las conformaciones de cadena principal deseadas. Es más preferible que los segmentos génicos de la línea germinal seleccionados se expresen frecuentemente en la naturaleza y, más preferentemente, que sean los que más frecuentemente se expresan de todos los segmentos génicos de la línea germinal naturales.

En el diseño de dominios variables sencillos o bibliotecas de los mismos, la incidencia de las conformaciones de cadena principal diferentes para cada uno de los seis bucles de unión a antígeno puede considerarse por separado. Para H1, H2, L1, L2 y L3, se selecciona una conformación dada que se adopta por el entre el 20% y el 100% de los bucles de unión a antígeno de moléculas de origen natural. Típicamente, su incidencia observada está por encima del 35% (es decir, entre el 35% y el 100%) e, idealmente, por encima del 50% o incluso por encima del 65%. Puesto que la gran mayoría de los bucles H3 no tienen estructuras canónicas, es preferible seleccionar una conformación de cadena principal que sea común entre esos bucles que no presentan estructuras canónicas. Para cada uno de los bucles, por lo tanto, se selecciona la conformación que se observa con más frecuencia en el repertorio natural. En anticuerpos humanos, las estructuras canónicas más populares (CS) para cada bucle son las siguientes: H1 - CS 1 (79% del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46%), L1 - CS 2 de  $V_H$  (39%), L2 - CS 1 (100%), L3 - CS 1 de  $V_H$  (36%) (el cálculo asume una proporción de  $\kappa:\lambda$  de 70:30, Hood y col. (1967) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48: 133). Para bucles H3 que tienen estructuras canónicas, una longitud de CDR3 (Kabat y col. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, U.S. Department of Health and Human Services) de siete restos con un puente salino del resto 94 al resto 101 parece ser la más común. Existen al menos 16 secuencias de anticuerpos humanos en la biblioteca de datos EMBL con la longitud de H3 necesaria y los restos clave para formar esta conformación y al menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteínas que pueden usarse como base para el modelado de anticuerpos (2cgr y 1tet). Los segmentos génicos de la línea germinal expresados más frecuentemente que adoptan esta combinación de estructuras canónicas son el segmento  $V_H$  3-23 (DP-47), el segmento  $J_H$  JH4b, el segmento  $V_k$

O2/O12 (DPK9) y el segmento J<sub>κ</sub> J<sub>κ</sub>1. Estos segmentos pueden usarse, por lo tanto, en combinación como base para construir una biblioteca con la conformación de cadena principal sencilla deseada.

Como alternativa, en lugar de seleccionar la conformación de cadena principal sencilla basándose en la aparición natural de las diferentes combinaciones de cadena principal para cada uno de los bucles de unión por separado, se usa la aparición natural de combinaciones de conformaciones de cadena principal como base para escoger la conformación de cadena principal sencilla. En el caso de anticuerpos, por ejemplo, puede determinarse la aparición natural de combinaciones de estructura canónica para dos, tres, cuatro o cinco cualquiera o para los seis bucles de unión a antígeno. En el presente documento, es preferible que la conformación seleccionada sea común en anticuerpos de origen natural y más preferente que se observe más frecuentemente en el repertorio natural. Por lo tanto, en anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando se consideran combinaciones naturales de los cinco bucles de unión a antígeno, H1, H2, L1, L2 y L3, se determina la combinación más frecuente de estructuras canónicas y después se combina con la conformación más popular para el bucle H3 como base para escoger la conformación de cadena principal sencilla.

#### b. Diversificación de la secuencia canónica

La diversidad deseada se genera típicamente variando la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones a modificar pueden seleccionarse aleatoriamente o se seleccionan preferentemente. La variación puede conseguirse después por aleatorización, durante la que se sustituye el aminoácido residente por cualquier aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, produciendo un número muy grande de variantes o por sustitución del aminoácido residente por uno o más de un subconjunto definido de aminoácidos, produciendo un número más limitado de variantes.

Se han presentado diversos procedimientos para introducir dicha diversidad. Pueden usarse PCR con tendencia a errores (Hawkins y col. (1992) J. Mol. Biol., 226: 889), mutagénesis química (Deng y col. (1994) J Biol. Chem., 269: 9533) o cepas mutantes bacterianas (Low y col. (1996) J Mol. Biol., 260: 359) para introducir mutaciones aleatorias en los genes que codifican la molécula. También son bien conocidos en la técnica procedimientos para mutar posiciones seleccionadas e incluyen el uso de oligonucleótidos emparejados erróneamente u oligonucleótidos degenerados, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, se han generado varias bibliotecas de anticuerpos sintéticos por dirección de mutaciones a los bucles de unión a antígeno. La región H3 de un Fab de unión a toxoide tetánico humano se ha aleatorizado para crear una serie de nuevas especificidades de unión (Barbas y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457). Se han añadido regiones H3 y L3 aleatorias o semialeatorias a segmentos génicos V de la línea germinal para producir grandes bibliotecas con regiones flanqueantes no mutadas (Hoogenboom y Winter (1992) J. Mol. Biol., 227: 381; Barbas y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457; Nissim y col. (1994) EMBO J., 13: 692; Griffiths y col. (1994) EMBO J., 13: 3245; De Kruif y col. (1995) J. Mol. Biol., 248: 97). Dicha diversificación se ha ampliado para incluir algunos o todos los demás bucles de unión a antígeno (Cramer y col. (1996) Nature Med., 2: 100; Riechmann y col. (1995) Bio/Technology, 13: 475; Morphosys, documento WO97/08320, anteriormente).

Puesto que la aleatorización de bucles tiene el potencial de crear aproximadamente más de 10<sup>15</sup> estructuras para H3 solamente y un número similarmente grande de variantes para los otros cinco bucles, no es factible usando la tecnología transformación actual o incluso usando sistemas sin células para producir una biblioteca que represente todas las combinaciones posibles. Por ejemplo, en una de las bibliotecas más grandes construidas hasta la fecha, se generaron 6 x 10<sup>10</sup> anticuerpos diferentes, que es sólo una fracción de la diversidad potencial para una biblioteca de este diseño (Griffiths y col. (1994) mencionado anteriormente).

Además de la eliminación de miembros no funcionales y el uso de una sola conformación de cadena principal conocida, estas limitaciones se abordan diversificando solamente los restos que estén directamente implicados en la creación o modificación de la función deseada de la molécula. Para muchas moléculas, la función será unirse a una diana y por lo tanto la diversidad debería concentrarse en el sitio de unión a diana, mientras se evita cambiar restos que sean cruciales para el empaquetamiento global de la molécula o el mantenimiento de la conformación de cadena principal seleccionada.

#### E. Caracterización de dAb-grupos efectores de acuerdo con la presente invención

La unión de anticuerpo de dominio sencillo-grupos efectores (dAb-grupo efector) de acuerdo con la invención con sus antígenos o epítopes específicos puede ensayarse por procedimientos con los que estarán familiarizados los expertos en la materia e incluyen ELISA. En una realización preferida, la unión se ensaya usando ELISA de fagos monoclonales.

El ELISA de fagos puede realizarse de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado: a continuación se expone un protocolo ejemplar.

Pueden explorarse poblaciones de fagos producidos en cada ronda de selección para determinar su unión por ELISA al antígeno o epítipo seleccionado, para identificar anticuerpos de fagos "policlonales". Después, pueden explorarse por ELISA fagos de colonias bacterianas infectadas individuales de estas poblaciones para identificar anticuerpos de fago "monoclonales". También es deseable explorar fragmentos de anticuerpo solubles para determinar su unión a un antígeno o epítipo, y esto también puede conseguirse por ELISA usando reactivos, por ejemplo, contra un marcador

C- o N-terminal (véase, por ejemplo, Winter y col. (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55 y referencias citadas en el mismo).

La diversidad de los anticuerpos monoclonales de fago seleccionados también puede evaluarse por electroforesis en gel de productos de PCR (Marks y col. 1991, mencionado anteriormente; Nissim y col. 1994 mencionado anteriormente), tratamiento con sonda (Tomlinson y col., 1992) J. Mol. Biol. 227, 776) o por secuenciación del ADN del vector.

#### F. Construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención

En general, las moléculas de ácido nucleico y construcciones de vector necesarias para el funcionamiento de la presente invención pueden construirse y manipularse como se expone en manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Estados Unidos.

La manipulación de ácidos nucleicos en la presente invención se realiza típicamente en vectores recombinantes.

Como se usa en el presente documento, el término vector se refiere a un elemento discreto que se usa para introducir ADN heterólogo en células para su expresión y/o replicación. Son bien conocidos por un experto en la materia procedimientos mediante los que seleccionar o construir y, posteriormente, usar dichos vectores. Están disponibles públicamente numerosos vectores, incluyendo plásmidos bacterianos, bacteriófagos, cromosomas artificiales y vectores episomales. Dichos vectores pueden usarse para clonación simple y mutagénesis; como alternativa, se emplea un vector de expresión génica. Un vector de utilidad de acuerdo con la invención puede seleccionarse para alojar una secuencia codificante de polipéptido de un tamaño deseado, típicamente de 0,25 kilobases (kb) a 40 kilobases o más de longitud. Una célula huésped adecuada se transforma con el vector después de manipulaciones de clonación *in vitro*. Cada vector contiene diversos componentes funcionales, que incluyen generalmente un sitio de clonación (o "poliengarce"), un origen de replicación y al menos un gen marcador de selección. Si un vector dado es un vector de expresión, además posee uno o más de los siguientes: elemento potenciador, promotor, y secuencias señal y de terminación de la transcripción, cada una situada cerca del sitio de clonación, de modo que estén unidas operativamente al gen que codifica un polipéptido.

Los vectores tanto de clonación como de expresión contienen generalmente secuencias de ácido nucleico que permiten que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Típicamente, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente en el ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias replicantes de forma autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen plasmídico de 2 micrómetros es adecuado para levaduras y diversos orígenes virales (por ejemplo, SV 40, adenovirus) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero a menos que se usen en células de mamífero capaces de replicar altos niveles de ADN, tales como células COS.

Ventajosamente, un vector de clonación o expresión puede contener un gen de selección también denominado marcador de selección. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección, por lo tanto, no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos no disponibles en los medios de cultivo.

Puesto que la replicación de vectores se realiza más convenientemente en *E. coli*, es de utilidad un marcador de selección en *E. coli*, por ejemplo, el gen de la  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Éstos pueden obtenerse a partir de plásmidos de *E. coli*, tales como pBR322 o un plásmido pUC tal como pUC18 o pUC19 o pUC119.

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

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen, por ejemplo, los sistemas de  $\beta$ -lactamasa y promotor de lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán generalmente una secuencia de Shine-Dalgarno unida operativamente a la secuencia codificante.

Los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos que corresponde a un polipéptido. Por lo tanto, la selección con antígeno puede realizarse por propagación y expresión

por separado de un solo clon que exprese el polipéptido o mediante el uso de cualquier sistema de presentación de selección. Como se ha descrito anteriormente, el sistema de presentación de selección preferido es presentación en bacteriófagos. Por lo tanto, pueden usarse vectores de fago o fagémido. Los vectores preferidos son vectores de fagémido que tienen un origen de replicación de *E. coli* (para replicación de doble cadena) y también un origen de replicación de fago (para la producción de ADN monocatenario). La manipulación y la expresión de dichos vectores son bien conocidas en la técnica (Hoogenboom y Winter (1992) mencionado anteriormente; Nissim y col. (1994) mencionado anteriormente). En resumen, el vector contiene un gen de  $\beta$ -lactamasa para conferir selectividad al fagémido y un promotor lac cadena arriba de un casete de expresión constituido por (del extremo N- a C-terminal) una secuencia líder de pIB (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplásmico), un sitio de clonación múltiple (para clonar la versión de nucleótidos del polipéptido), opcionalmente uno o más marcadores peptídicos (para la detección), opcionalmente uno o más codones de terminación TAG y la proteína de fago pIII. Por lo tanto, usando diversas cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con adición de glucosa, isopropil tio- $\beta$ -D-galactósido (IPTG) o un fago auxiliar, tal como VCS M 13, el vector es capaz de replicarse como un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades del polipéptido solamente o producir fagos, de los que algunos contienen al menos una copia de la fusión de polipéptido-pIII en su superficie.

La construcción de vectores de acuerdo con la invención emplea técnicas de ligación convencionales. Los vectores aislados o fragmentos de ADN se escinden, adaptan y religan en la forma deseada para generar el vector necesario. Si se desea, puede realizarse un análisis de una forma conocida para confirmar que las secuencias correctas están presentes en el vector construido. Los procedimientos adecuados para construir vectores de expresión, preparar transcritos *in vitro*, introducir ADN en células huésped y realizar análisis para evaluar la expresión y función son conocidos por los expertos en la materia. La presencia de una secuencia génica en una muestra se detecta, o su amplificación y/o expresión se cuantifica por procedimientos convencionales, tales como análisis de Southern o Northern, transferencia de Western, transferencia puntual de ADN, ARN o proteína, hibridación *in situ*, inmunocitoquímica o análisis de secuencia de moléculas de ácido nucleico o proteína. Los expertos en la materia imaginarán fácilmente como pueden modificarse estos procedimientos, si se desea.

#### G: Uso de dAb-grupos efectores de acuerdo con la invención

Los dAb-grupos efectores seleccionados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención pueden emplearse en aplicaciones terapéuticas y profilácticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, aplicaciones de reactivos y ensayos *in vitro* y similares. Por ejemplo, los dAb-grupos efectores pueden usarse en técnicas de ensayo basadas en anticuerpos, tales como técnicas de ELISA, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

Los expertos en la materia apreciarán que los dAb-grupos efectores de la invención pueden prepararse de acuerdo con una especificidad de unión a antígeno predeterminada o deseada. Además, el procedimiento de la invención permite las síntesis de dAb-grupos efectores con un grupo efector deseado, de este modo, las funciones efectoras pueden diseñarse en el dAb-grupo efector. Además, los presentes inventores han descubierto que la presencia del grupo efector aumenta la semivida *in vivo* de la molécula.

Como se ha mencionado anteriormente, los dAb-grupos efectores de acuerdo con la invención son de utilidad en procedimientos de diagnóstico, profilácticos y terapéuticos. Los anticuerpos de dominio sencillo-grupo efector (dAb-grupos efectores) seleccionados de acuerdo con la invención son de utilidad diagnósticamente en análisis de Western y detección de proteínas *in situ* por procedimientos inmunohistoquímicos convencionales; para su uso en estas aplicaciones, los anticuerpos de un repertorio seleccionado pueden marcarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Además, dichos polipéptidos de anticuerpo pueden usarse de forma preparativa en procedimientos de cromatografía de afinidad cuando forman complejos con un soporte cromatográfico, tal como una resina. Todas dichas técnicas son bien conocidas por un experto en la materia.

Sustancialmente, se prefieren dAb-grupos efectores de acuerdo con la presente invención de una homogeneidad de al menos el 90 al 95% para su administración a un mamífero, y se prefiere más una homogeneidad del 98 al 99% o mayor para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un ser humano. Una vez purificado, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los dAb-grupos efectores seleccionados pueden usarse diagnósticamente y/o terapéuticamente (incluyendo de forma extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (Lefkovite y Pernis, (1979 y 1981) Immunological Methods, Volúmenes I y II, Academic Press, NY).

Los dAb-grupos efectores de la presente invención encontrarán utilidad típicamente en la prevención, supresión o tratamiento de estados inflamatorios, hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o vírica y trastornos autoinmunes (que incluyen, pero sin limitación, diabetes Tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y miastenia grave).

En la presente solicitud, el término "prevención" implica la administración de la composición protectora *antes de la inducción* de la enfermedad. El término "supresión" se refiere a la administración de la composición después de un acontecimiento inductor, pero *antes de la aparición* clínica de la enfermedad. El término "tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que se manifiesten los síntomas de la enfermedad.

Se dispone de sistemas de modelo animal que pueden usarse para explorar los dAb-grupos efectores en la protección frente o el tratamiento de la enfermedad. Se conocen en la técnica procedimientos para el ensayo de lupus eritematoso sistémico (LES) en ratones susceptibles (Knight y col. (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten y col. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515). La miastenia grave (MG) se ensaya en ratones hembra SJL/J por inducción de la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom y col. (1988) Adv. Immunol., 42: 233). La artritis se induce en una cepa susceptible de ratones por inyección de colágeno Tipo II (Stuart y col. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233). Se ha descrito un modelo por el que se induce artritis con adyuvante en ratas susceptibles por inyección de proteína de choque térmico micobacteriana (Van Eden y col. (1988) Nature, 331: 171). La tiroiditis se induce en ratones por administración de tiroglobulina como se describe (Maron y col. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115). La diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) se produce de forma natural o puede inducirse en ciertas cepas de ratones tales como las descritas por Kanasawa y col. (1984) Diabetologia, 27: 113. La EAE en ratones y ratas sirve como modelo para la EM en seres humanos. En este modelo, la enfermedad desmielinizante se induce por administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer y col., eds., Grune y Stratton, Nueva York, págs. 179-213; McFarlin y col. (1973) Science, 179: 478; y Satoh y col. (1987) J. Immunol., 138: 179).

Generalmente, los dAb-grupos efectores se utilizarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo cualquiera solución salina y/o medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico y Ringer con lactato. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si es necesario mantener un complejo polipeptídico en suspensión, pueden seleccionarse de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen soluciones de reposición de líquidos y nutrientes y soluciones de reposición de electrolitos, tales como las basadas en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición).

Los dAb-grupos efectores de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Estos pueden incluir diversos fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de diversos agentes citotóxicos o de otro tipo junto con los dAb-grupos efectores de la presente invención, o incluso combinaciones de dAb-grupos efectores de acuerdo con la presente invención que tienen especificidades diferentes, tales como dAb-grupos efectores que tienen dominios variables seleccionados usando ligandos diana diferentes, independientemente de que se combinen o no antes de la administración.

La vía de administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de las conocidas comúnmente por los expertos habituales en la materia. Para la terapia, incluyendo sin limitación inmunoterapia, los dAb-grupos efectores y composiciones de la invención pueden administrarse a cualquier paciente de acuerdo con técnicas convencionales. La administración puede ser de cualquier modo apropiado, incluyendo por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, por medio de la vía pulmonar o también, de forma apropiada, por infusión directa con un catéter. La dosificación y frecuencia de administración dependerán de la edad, sexo y estado del paciente, de la administración simultánea de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros a tener en cuenta por el médico.

Los dAb-grupos efectores de la presente invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su uso. Se ha demostrado que esta técnica es eficaz con inmunoglobulinas convencionales y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Se apreciará por los expertos en la materia que la liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad de anticuerpo (por ejemplo, con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse hacia arriba para compensar.

Las composiciones que contienen los dAb-grupos efectores o un cóctel de los mismos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para conseguir una inhibición, supresión, modulación, destrucción o algún otro parámetro medible al menos parcial de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades necesarias para conseguir esta dosificación dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmune del paciente, pero variarán generalmente de 0,005 a 5,0 mg de anticuerpo seleccionado, receptor (por ejemplo, un receptor de células T) o proteína de unión al mismo por kilogramo de peso corporal, usándose más comúnmente dosis de 0,005 a 2,0 mg/kg/dosis. Para aplicaciones profilácticas, también pueden administrarse composiciones que contienen los dAb-grupos efectores o cócteles de los mismos en dosificaciones similares o ligeramente inferiores.

Una composición que contiene un dAb-grupo efector o cóctel del mismo de acuerdo con la presente invención puede utilizarse en entornos profilácticos y terapéuticos para contribuir a la alteración, inactivación, destrucción o eliminación de una población de células diana seleccionada en un mamífero. Además, los dAb-grupos efectores descritos en el presente documento pueden usarse de forma extracorpórea o *in vitro* selectivamente para destruir, reducir el número o eliminar eficazmente de otro modo una población de células diana de una colección de células heterogénea.

## ES 2 346 431 T3

Puede combinarse sangre de un mamífero de forma extracorpórea con los anticuerpos seleccionados, receptores de superficie celular o proteínas de unión de los mismos de modo que las células no deseadas se destruyan o eliminen de otro modo de la sangre para su devolución al mamífero de acuerdo con técnicas convencionales.

5 La invención se describe además, con fines ilustrativos solamente, en los ejemplos siguientes.

### Ejemplo 1

#### 10 Creación de construcciones de fusión dAb-Fc

Este ejemplo demuestra un procedimiento para generar fusiones  $V_{\kappa}$ -Fc y  $V_H$ -Fc (para ambas fusiones, Fc procede de IgG1, el Fc=bisagra-CH2-CH3). Se usó un dAb  $V_{\kappa}$  de unión a  $\beta$ -galactosidasa E5 para generar una fusión  $V_{\kappa}$ -Fc y un dAb  $V_H$  de unión a fosfatasa alcalina (APS) VH2 se usó para generar una fusión  $V_H$ -Fc (las secuencias de dAb  $V_{\kappa}$  E5 y dAb  $V_H$  VH2 se muestran en la Tabla 1a).

Se introdujeron sitios de restricción Hind III y Not I en los extremos 5' y 3', respectivamente, de los dAb E5 y VH2 usando los oligonucleótidos VK5Hind, VH5Hind y VH3Not (Tabla 1a, obsérvese que no hay necesidad de introducir un sitio Not I en el extremo 3' del dAb E5 puesto que ya existe).

20 Para crear fusiones E5-Fc y VH2-Fc, después se ligaron fragmentos digeridos con Hind III/Not I que contenían dAb  $V_{\kappa}$  E5 y dAb  $V_H$  VH2 en el vector plgplus Signal digerido con Hind III/Not I (R y D Systems Europe Ltd, Figura 2). Las mezclas de ligación se usaron para transformar células *E. coli* TG1 competentes y se verificaron los clones recombinantes por exploración por PCR de colonias y secuenciación usando los oligonucleótidos PIG5SEQ y PIG3SEQ (Tabla 1b).

TABLA 1a

30

	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia (de 5' a 3')</b>
35	VK5HTND	CCC AAG CTT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC
	VH5HIND	CCC AAG CTT GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GG
40	VH3NOT	TTT TCC TTT TGC GGC CGC GCT CGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC
45	PIG5SEQ	ACT CAC TAT AGG GAG ACC CA
	PIG3SEQ	CAT GTG TGA GGT TTG TCA CAA

50

55

60

65

cadena V<sub>H</sub>

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
123456789012345678901234567890	12345	67890123456789	012a3456789012345	67890123456789012345	67890123456789012a2b3c4	5678901234	5678901234	5678901234	5678901234	5678901234
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTPS	SYAMS	HVRQAPGKGLRWIS	AISGGSGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLXLQNSLRAREDPAVYCAK	SYGAFDY	WQQSTILTVSS				
D-GAT-SK-G-P							KVLIT			

V<sub>H</sub> simulada  
VH2  
cadena V<sub>K</sub>

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456	78901234567890123456789012345678	901234567	89012345678			
DIQWTQSPSSLASVGDRTTIC	RASQSISSYLN	WYQKPKAPKLLIY	AASSLOS	GVPSRPSGSGSGTDFITISLSIQDPDPATYYC	QQSYSTPHT	FGQGTAYEIKR			
L-R							--NWL-P-		

V<sub>K</sub> simulada  
E5

Tabla 1b



## Ejemplo 2

*Expresión de las proteínas de fusión dAb-Fc en células de mamífero*

5 Este ejemplo demuestra que las fusiones de E5-Fc y VH2-Fc (Ejemplo 1) podían expresarse en células de mamífero y que las proteínas producidas conservan la especificidad de antígeno de los dAb parentales.

10 Tres líneas celulares de mamífero (COS 1, COS7 y CHO) se transfectaron con dAb E5 en pIgplus y dAb VH2 en ADN plasmídico de pIgplus (Ejemplo 1) usando el Reactivo de Transfección FuGENE 6 (Roche). Se generaron líneas celulares transformadas de forma estable usando medio de selección que contenía G418 (1 mg/ml para células COS1 y COS7 y 0,5 mg/ml para células CHO).

15 Para comprobar la expresión de las proteínas de fusión dAb-Fc, se recogieron 25 ml del medio de cultivo de tejidos gastado de células transfectadas, se filtraron usando un filtro de 0,45  $\mu$ m y después se pasaron a través de una columna de Proteína A Sepharose. Se eluyeron fusiones dAb-Fc usando 1,6 ml de glicina 0,1 M, pH 2,0 en 0,4 ml de Tris 1 M, pH 9,0. Se ensayaron 50  $\mu$ l de la muestra de 2 ml resultante en ELISA (se siguió el protocolo de ELISA convencional). Se revistieron placas de 96 pocillos con 100  $\mu$ l de APS y  $\beta$ -galactosidasa a una concentración de 10  $\mu$ g/ml en PBS durante una noche a 4°C. Se realizó la detección usando conjugado anti-IgG humana (específico de Fc)-HRP (Sigma). Los resultados del ELISA demuestran que todas las líneas celulares están expresando fusiones cLab-Fc de especificidades correctas (Figura 3c). No se observó reactividad cruzada con antígenos irrelevantes (APS para E5-Fc y  $\beta$ -galactosidasa para VH2-Fc) (Figura 3).

20 El análisis de las cadenas de dAb-Fc en el gel de SDS (no reductor) indica que se están produciendo principalmente como dímeros (unidas por puentes disulfuro en la bisagra) con un PM de aproximadamente 80 kDa (Figura 3a). También es visible una banda de 40 kDa en el gel (Figura 3a) indicando que parte de la proteína también está presente en la forma monomérica.

La tinción para glicosilación puso de manifiesto que la proteína E5-Fc está glicosilada (Figura 3b).

30 Después de la optimización de los procedimientos de expresión y purificación, el rendimiento de la proteína de fusión E5-Fc a partir de células COS1 es de 20 mg/l. El nivel de expresión de la fusión VH2-Fc es inferior.

## Ejemplo 3

35

*Unión de la proteína de fusión E5-Fc a la línea celular que expresa receptores de Fc humana*

40 Este ejemplo demuestra que la proteína de fusión E5-Fc es capaz de unirse a la línea celular que expresa receptores de Fc humana. Se marcó la proteína E5-Fc purificada con fluoresceína a una proporción de 3,3/1 de Fluo/Proteína. La proteína marcada (concentración de 491  $\mu$ g/ml) se usó después para el análisis de FACS. Se usaron células tipo monocito humanas U937 que expresan dos tipos de FcR humanos (CD 64 y CD32) para evaluar la capacidad de la proteína de fusión E5-Fc para unir estos receptores. Los resultados de FACS indican que la proteína de fusión E5-Fc se une a la línea celular U937 (se incubaron  $5 \times 10^5$  células U-937 con 80  $\mu$ l de la dilución 1:50 de la proteína marcada y se examinaron vivas) (Figura 4). Los estudios de bloqueo de receptor en células U-937 indicaron que la cadena de E5-Fc se une principalmente al receptor CD32 (no se muestran los datos). Para confirmar este resultado, se usaron células Raj 1 (que expresan solamente el receptor CD32) para el análisis de FACS. Los resultados de FACS demuestran que la cadena E5-Fc se une a células Raj 1 (Figura 5).

## Ejemplo 4

*Análisis farmacocinético de la fusión dAb-Fc*

55 Para el análisis farmacocinético se inyectaron i.v. en la vena de la cola de 6 grupos de tres ratones CD1 macho (de una edad de aproximadamente 6 a 7 semanas; pesos corporales de aproximadamente 25 a 30 g) 50  $\mu$ g de dAb-Fc (E5-Fc como se describe en el Ejemplo 1). La proteína E5-Fc se purificó a partir de una línea celular de mamífero como se describe en el Ejemplo 2 y se dializó dos veces durante >2 h frente a 500 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato. Se inyectaron i.v. en la vena de la cola a 6 grupos de tres ratones CD1 macho (de una edad de aproximadamente 6 a 7 semanas; pesos corporales de aproximadamente 25 a 30 g) 50  $\mu$ g de dAb (un dAb anti-lisozima de huevo de gallina denominado HEL-4 que tiene un marcador epitópico HA C-terminal, véase a continuación la secuencia de aminoácidos). HEL-4 se expresó en la cepa de *E. coli* HB2151 y se purificó a partir de la fracción periplásmica por cromatografía convencional usando proteína A e intercambio aniónico. La proteína se dializó dos veces durante >2 h frente a 500 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato.

65

*La secuencia de aminoácidos de HEL-4*

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRISDEDMGWVRQAPGKGLEWVSSIYGP  
 5 SGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASA LEPLSEPLGF  
 WGQGT LVTVSSAAYPYDVPDYA

10 A los puntos temporales seleccionados, 3 animales de cada grupo se sacrificaron humanitariamente y se recogió una muestra de sangre terminal. Se dejó que la sangre coagulara (aproximadamente 30 min.) y después se centrifugó para preparar el suero. El suero se decantó y se almacenó congelado hasta su análisis. Para determinar las concentraciones de dAb o dAb-proteína Fc, las muestras de suero se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween-20 al 2% (v/v) y se ensayaron por ELISA de captura de antígeno. Para HEL-4, el antígeno era lisozima de huevo  
 15 de gallina que se aplicó como un revestimiento durante una noche en una placa Maxisorp (Nunc) a 3 mg/ml en tampón que contenía Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 2,93 g/l, pH 9,6 a 4°C. Para E5-Fc, el antígeno era  $\beta$ -galactosidasa aplicada como un revestimiento durante una noche en una placa Maxisorp (Nunc) a 10  $\mu$ g/ml en solución salina tamponada con fosfato a 4°C. La unión de HEL-4 y E5-Fc a sus antígenos respectivos se detectó usando un anticuerpo monoclonal de rata anti-epítipo de HA marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (Roche) o un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc humano marcado con HRP (Sigma), respectivamente. Se usaron concentraciones conocidas de HEL-4 y E5-Fc  
 20 para calibrar estas lecturas. Los resultados del experimento farmacocinético en ratón (Figura 6 y Tabla 2) demuestran una semivida muy aumentada en el suero para dAb fusionado a una región Fc en comparación con un dAb.

TABLA 2

	t1/2 $\alpha$ (h)	t1/2 $\beta$ (h)	AUC (0- $\infty$ ) (mg.min/ml)
HEL-4	0,067	0,34	0,1
E5-Fc	2	25,4	31,8

## Ejemplo 5

*Estudio de eficacia de TAR1-5-19 en un modelo transgénico de TNF humano de artritis*

El TAR1-5-19, como se denomina en el presente documento, es un dAb que se une específicamente a la diana TNF alfa humano (TAR1).

45 Los ratones Tg197 son transgénicos para el gen híbrido de TNF humano-globina y los heterocigotos a las 4-7 semanas de edad desarrollan una poliartritis progresiva crónica con características histológicas en común con la artritis reumatoide. [Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., Kollias, G. (1991). Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. EMBO J., Vol. 10, págs. 4025-4031].

50 Para ensayar la eficacia de una fusión de dAb V <sub>$\kappa$</sub>  con Fc (dAb fusionado a regiones CH2-CH3 de IgG1, siendo el dAb TAR1-5-19) en la prevención de la artritis en el modelo de Tg197, se dividieron ratones transgénicos heterocigotos en 5 grupos de 10 animales con igual número de machos y hembras. El tratamiento comenzó a las 3 semanas de edad con inyecciones intraperitoneales dos veces por semana de los artículos de ensayo. Los grupos de tratamiento se  
 55 enumeran en la Tabla 1. El dAb-Fc de control era una fusión entre la región Fc de IgG1 humana y un dAb anti- $\beta$ -galactosidasa (denominado E5) y se expresó en el sobrenadante de una línea celular COS-7 transfectada de forma estable. La fusión TAR1-5-19-Fc se expresó por transfección transitoria de COS-7. Ambas proteínas de fusión con Fc se purificaron por cromatografía de proteína A. El monómero TAR1-5-19 se expresaba en *E. coli* y se purificó por cromatografía de proteína L e IEX. Todas las preparaciones de proteína eran en solución salina tamponada con fosfato  
 60 y se ensayaron para niveles aceptables de endotoxinas.

## ES 2 346 431 T3

TABLA 3

*Grupos de tratamiento y dosificación*

Grupo	Tratamiento	Dosis Dos Veces por Semana
1	Fusión dAb-Fc de Control	10 mg/kg
2	Fusión de TAR1-5-19-Fc	10 mg/kg
3	Fusión de TAR1-5-19-Fc	1 mg/kg
4	Monómero de TAR1-5-19	20 mg/kg
5	Control de solución Salina	N/A

El estudio se realizó con un diseño ciego. Cada semana los animales se pesaron y se puntuaron los signos macrofenotípicos de artritis de acuerdo con el sistema siguiente: 0 = sin artritis (aspecto y flexión normal), 1 = artritis ligera (distorsión articular), 2 = artritis moderada (hinchamiento, deformación de la articulación), 3 = artritis intensa (movimiento gravemente afectado). La semana 10, el tobillo/pata y las articulaciones de la rodilla de los animales se fijaron, se embebieron y se realizó un análisis histopatológico en la articulación del tobillo usando el sistema siguiente: 0 = sin patología detectable, 1 = hiperplasia de la membrana sinovial y presencia de infiltrados polimorfonucleares, 2 = formación de tejido fibroso y tejido de granulación y erosión de hueso subcondral focal, 3 = destrucción de cartílago articular y erosión ósea, 4 = amplia destrucción de cartílago articular y erosión ósea. La histología se puntuó con un diseño ciego.

El resultado de la puntuación artrítica demostraba claramente que 10 mg/kg de la fusión TAR1-5-19-Fc inhibía el desarrollo de la artritis (véase la Figura 7). Una comparación de las puntuaciones artríticas medias a la semana 10 de TAR1-5-19-Fc con dAb-Fc de control, el monómero de TAR1-5-19 o el control de solución salina daba un efecto estadísticamente significativo ( $P < 0,1\%$ ). La baja dosis de TAR1-5-19-Fc producía una puntuación artrítica media inferior que dAb-Fc de control, sin embargo, la diferencia no era estadísticamente significativa. Existían algunas pruebas ( $P < 5\%$ ) de que la artritis estuviera apareciendo antes en el grupo de solución salina en comparación con el grupo de TAR1-5-19-Fc a 1 mg/Kg.

Los resultados de la puntuación macrofenotípica de la artritis en las articulaciones se reflejaron en la puntuación histopatológica (véase la Figura 8). El tratamiento profiláctico con una alta dosis de TAR1-5-19-Fc dio como resultado una menor puntuación histopatológica en comparación con los grupos de control.

La caquexia, que es un efecto de los niveles aumentados de TNF circulante en los animales transgénicos, se inhibía claramente por el TAR1-5-19-Fc (alta dosis) (véase la Figura 9).

En conclusión, se demostró que el TAR1-5-19-Fc era una terapia altamente eficaz en el modelo de artritis Tg197.

### Ejemplo 6

#### *Expresión de una proteína de fusión dAb-Fc en Pichia pastoris*

##### *Construcción del vector*

El vector para la expresión secretada inducible por metanol de proteínas de fusión dAb-Fc en *Pichia* se construyó basándose en el vector de expresión pPICZalpha (Invitrogen). El vector se modificó para retirar el sitio XhoI en el nucleótido 1247 por digestión con XbaI y KpnI, formación de extremos romos con Pfu polimerasa y religación. El sitio SalI en el nucleótido 1315 se eliminó por digestión con SalI, formación de extremos romos con Pfu polimerasa y religación. Después se amplificó con PCR una fusión de dAb VK-Fc a partir de una construcción de expresión de mamífero descrita anteriormente usando los cebadores proporcionados a continuación y ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene)

PVKF2 5'-TCTCTCGAGAAAAGAGACATCCAGATGACCCAGTCTCC-3'  
FcPicR1 5'-TAGAATTCTCATCATTTACCCGGAGACAGGGAGA-3'

El producto de PCR se digirió con XhoI y EcoRI y después se clonó en un vector de expresión digerido con EcoRI/XhoI. Esto dio la construcción pPICZalpha-TAR1-5-19Fc que produciría un anti-proteína de fusión de TNF-Fc.

## ES 2 346 431 T3

Para construir un vector general para la producción de fusiones con Fc de dAb VH o VK, el fragmento de dAb XhoI-NotI se escindió de pPICZalpha-TAR1-5-19Fc, y se sustituyó por un engarce XhoI-NotI que contenía un sitio SalI en fase de lectura (la secuencia del fragmento, incluyendo los sitios de restricción: 5'-CTCGAGAAAA GAGCGTCGACATCTAGATCAGCGGCCGC-3').

Otros dAb podrían clonarse después en este vector digerido con XhoI y NotI después de la amplificación por PCR usando los pares de cebadores siguientes y se clonaron como fragmentos XhoI y NotI.

Para dAb VH:

PVHF1 5'-TCTCTCGAGAAAAGAGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG-3'

PVHR2 5'-TAGAATTCTTATTAGCTAGAGACGGTGACCAGGGT-3'

Para dAb VK:

PVKF2 5'-TCTCTCGAGAAAAGAGACATCCAGATGACCCAGTCTCC-3'

PVKR1 5'-TAGAATTCTTATTACCGTTTGATTTCACCTTGGTC-3'

Las secuencias se verificaron por secuenciación con los cebadores siguientes

Cebador de factor alfa (directo): 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

3'AOX1 (inverso): 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Toda la clonación se realizó en células *E. coli* TOP10F'. Los vectores se linealizaron con PmeI antes de la transformación de *Pichia*.

Este vector, cuando se integre en el genoma de *P. pastoris*, expresará la proteína de fusión de dAb recombinante anti-TNF-Fc TAR1-5-19Fc tras la inducción con metanol. La proteína se producirá con una señal de secreción de factor de conjugación alfa de levadura amino-terminal, que dirigirá la secreción al medio de cultivo, durante la que se eliminará por escisión mediante la proteasa Kex2, para dejar una proteína de fusión dAb-Fc homogénea que puede purificarse a partir del sobrenadante de cultivo.

La proteína producida en el presente documento tiene un sitio de escisión de proteasa para el Factor Xa entre el dAb y la región Fc. Esto ayuda al análisis funcional de la proteína, pero podría sustituirse por: un engarce polipeptídico flexible, un engarce polipeptídico rígido u otra secuencia de escisión por proteasa específica.

El uso de un sitio de escisión por proteasa específico proporcionaría ventajas reduciendo la cantidad de proteína que se une inespecíficamente a un antígeno en un tejido no diana que también expresase la proteasa seleccionada, cuando el tejido diana no expresa. Esto podría ser útil en inmunotoxinas dirigidas, conjugados de fármacos o enzimas de activación de profármacos.

A continuación y en la figura 10 se muestra la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión de dAb de factor alfa-Fc desde el inicio de la secuencia líder del factor alfa al sitio de clonación EcoRI

```
ATGAGATTTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGT
CAACACTACAACAGAAGATGAAACGGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAG
ATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGGTTATT
GTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAG
AGAGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTAC
CATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTGATAGTTATTTACATTGGTACCAGCAGAAACCAGG
GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCCGAGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTT
CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT
TGCTACGTACTACTGTCAACAGGTTGTGTGGCGTCTTTTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGT
GGAAATCAAACGGGCGGCCGCGGATCCCATCGAAGGTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTATCCCA
AATCTGTGACAAACCTCACACATGCCCATGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
```

## ES 2 346 431 T3

GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA  
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC  
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC  
AGCCTGACCTGCCTAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT  
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGGCCACGCCTCCCGTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC  
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCTCC  
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA  
TGATGAGAAATTC

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión dAb de factor alfa-Fc, según se codifica por la secuencia de nucleótidos anterior, se muestra a continuación y también en la figura 11.

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSdleGDFDVAVLFPFSNSTNNGLLFINT  
TIASIAAKEEGVSLEKREDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASEL  
QSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKRAAADPIEGRGGGGD  
**PKCDKPHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV**  
**DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK**  
**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGS**  
**FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK**

está subrayada la secuencia del líder de los factores de conjugación alfa de levadura. En cursiva está la secuencia del dAb. La porción Fc está en negrita. El dAb y la región Fc están separados por un espaciador polipeptídico, que contiene en este caso un sitio de escisión por proteasa del Factor Xa.

### Transformación de la cepa KM71H de *Pichia pastoris*

Se hicieron competentes células de *Pichia* por electroporación cultivando *P. pastoris* KM71H en medio YPD 0,51 (extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v)) a 30°C hasta una DO<sub>600nm</sub> de 1,0. Después, las células se lavaron dos veces con agua enfriada con hielo y una vez con 20 ml de sorbitol 1 M enfriado con hielo y se resuspendieron en 1 ml de sorbitol 1 M. Se incubaron 80 microlitros de la suspensión resultante en hielo con 10 microlitros de agua que contenía 10 microgramos de vector linealizado con PmeI producido como se ha descrito anteriormente durante 5 minutos y después se sometieron a electroporación en una cubeta de electroporación con un hueco entre los electrodos de 0,2 cm a 0,54 kV, 25 microFarad, con la resistencia ajustada al infinito en un Biorad Gene Pulser II con un extensor de capacitancia (Biorad). Las células se recuperaron en 1 ml de sorbitol 1 M, después se sembraron en placas de YPDS (extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v), sorbitol 1 M en agar al 1,5% (p/v)) complementado con 100, 500, 1000 o 2000 mg/ml de zeocina. Las placas se cultivaron durante 2-3 días a 30°C y, después, las colonias se volvieron a sembrar por estrías para aislar poblaciones clonales. Los propios clones se caracterizaron por sus niveles de expresión como se describe a continuación.

Este resultado también podría obtenerse en otras cepas de *Pichia pastoris* tales como X33, o las cepas deficientes en proteasa smd1163, smd1165 o smd1168 que serán ventajosas para reducir la escisión proteolítica de la proteína de fusión dAb-Fc durante la expresión. Como alternativa, otras especies de *Pichia* tales como *Pichia methanolica*, u otras levaduras y especies fúngicas tales como *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, o *Aspergillus awamori*, serían adecuadas para la expresión de proteínas de fusión dAb-Fc.

### Expresión

La expresión se llevó a cabo en matraces de agitación con deflectores en medio BMGY complejo que contiene glicerol como fuente de carbono (extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), glicerol al 1% (v/v), base de nitrógeno de levadura al 1,34% (p/v), biotina al 4x10<sup>-5</sup>% (p/v), tampón KPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 6,0). Los cultivos se dejaron crecer a 30°C con agitación a 250 rpm a una DO<sub>600nm</sub> de 10, después el sedimento se recuperó por centrifugación y se resuspendió en BMMY para inducir la expresión (extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), metanol al 0,5 (v/v), base de nitrógeno de levadura al 1,34% (p/v), biotina al 4x10<sup>-5</sup>% (p/v), tampón KPO<sub>4</sub> 100 mM pH 6,0). Se observaron niveles de expresión máxima de 30 miligramos/l entre las 24-48 h después de la inducción a 30°C.

También puede realizarse el cultivo y expresión en otros medios incluyendo medio mínimo o definido químicamente, así como en medios complejos, con resultados equivalentes. El cultivo a densidades celulares superiores en condiciones de suministro de fuente de carbono controlado, niveles de inducción con metanol controlados y niveles de oxígeno controlados en un fermentador usando procedimientos continuos o discontinuos, conduciría a mayores niveles de expresión.

## ES 2 346 431 T3

Si es necesario un patrón de glicosilación que esté más próximo al observado en seres humanos, podría obtenerse una glicosilación tipo mamífero usando modificaciones de las enzimas de glicosilación en *Pichia*, tales como las descritas en: Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischniewski H, Wildt S, Gemgross TU (2003). Production of complex human glycoproteins in yeast. Science. 29; 301 (5637):1171. Esto produciría un producto homogéneamente glicosilado.

### Purificación

La purificación se llevó a cabo en sobrenadante clarificado por centrifugación a 2000xg durante 20 min. a 4°C. El sobrenadante se cargó a 300 cm/h sobre un lecho de 20 cm de profundidad de matriz de Proteína A Streamline (Amersham Biotech). Después de la carga, se eliminó el material no unido por lavado con PBS complementado con NaCl 0,35 M. La proteína de fusión se eluyó con glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,0. Las fracciones se neutralizaron con 0,2 volúmenes de Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Se purificó adicionalmente la fusión dAb-Fc pura a partir de este material por cromatografía de intercambio iónico en una columna Resource Q de 5 ml (Amersham Biotech), con tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8,5 usando un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M durante 30 volúmenes de columna.

### Análisis

Los resultados se muestran en la figura 13.

La secuenciación amino terminal mostró que la proteína se había procesado como se esperaba por la proteasa Kex2 de *P. pastoris* para dar la secuencia amino-terminal de NH<sub>2</sub>-EDQIM después de 5 ciclos de degradación de Edman.

El análisis de SDS-PAGE reducido y no reducido (Figura 13) mostraba que la proteína era del mismo tamaño que la producida en células de mamífero usando la misma construcción de proteína de fusión TAR1-5-19-Fc en un vector de expresión de mamífero.

Más del 75% de los homodímeros de Fc estaban unidos por enlaces disulfuro intercatenarios, mientras que >25% no estaban unidos por enlaces disulfuro. Esto es similar a la situación observada en células de mamífero, en las que una parte de las proteínas de fusión con Fc existen como homodímeros no unidos por disulfuro.

El análisis de filtración en gel en una columna Superdex 75 (Amersham Biotech) dio el peso molecular esperado de 102,4 kDa, como se esperaba para un homodímero glicosilado.

### Actividad de unión a antígeno

Los resultados se muestran en la figura 12.

La actividad de unión a antígeno se determinó usando un ensayo de unión al receptor de TNF (figura 12). Se revistió una placa Nunc Maxisorp de 96 pocillos con un anticuerpo de ratón anti-Fc humana, se bloqueó con BSA al 1%, y después se añadió fusión de receptor de TNF1-Fc. La proteína de fusión dAb-Fc a diversas concentraciones se mezcló con 10 ng/ml de proteína TNF y se incubó a temperatura ambiente durante >1 h. Esta mezcla se añadió a las placas revestidas con proteína de fusión de receptor de TNF1-Fc y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron para eliminar la fusión dAb-Fc libre no unida, el TNF y los complejos dAb-Fc/TNF. Después, la placa se incubó secuencialmente con un anticuerpo biotinilado anti-TNF y peroxidasa de rábano picante cromogénico TMB. El desarrollo de color se interrumpió con la adición de ácido clorhídrico 1 M y se leyó la absorbancia a 450 nm. La lectura de absorbancia es proporcional a la cantidad de TNF unido, por lo tanto, la proteína de fusión TAR1-5-19Fc competirá con el receptor de TNF por su unión al TNF y reducirá la señal en el ensayo.

La proteína producida por *P. pastoris* tenía una actividad equivalente a la proteína de mamífero en el ensayo de receptor de TNF *in vitro* descrito anteriormente.

### Actividad de activación de complemento

La proteína producida era eficaz en la activación del complemento humano después de su unión a antígeno, como se midió por el ensayo siguiente:

Se revistieron placas Maxisorp de 96 pocillos con TNF humano a 1 microgramo/ml. La fusión dAb-Fc o el anticuerpo de control se unieron a las placas revestidas con TNF, que se lavaron con solución salina tamponada con fosfato para eliminar el anticuerpo no unido, y después se preincubaron con C1 del complemento humano a 1 microgramo/ml (Merck Biosciences, constituido por un complejo de la estequiometría: (C1r)<sub>2</sub> (C1s)<sub>2</sub> C1q) en tampón diluyente de fijación del complemento (Oxoid, barbitona 0,575 g/l, NaCl 8,5 g/l, MgCl<sub>2</sub> 0,168 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,028 g/l, barbitona soluble 0,185 g/l, pH 7,2), durante 30 minutos, después de los cuales se añadió el sustrato Metoxi-carbonil-Lys(z)-Gly-Arg-pNA (Bachem) a una concentración final de 2,5 mM. Éste se escindió por C1s activado para liberar pNA y el ensayo se continuó por desarrollo de color a 105 nm debido a la liberación de pNA.

## ES 2 346 431 T3

A 82,5 microgramos/ml, la fusión dAb-Fc dio una absorbancia a 405 nm de 0,09 UA por encima del fondo después de 180 min.

5 En situaciones en las que la activación del complemento es importante para la funcionalidad de la fusión dAb-Fc, tal como la lisis por el complemento de células tumorales diana, esta actividad es ventajosa. Si la fusión de Fc es para otras razones, en las que la activación del complemento no es necesaria o es perjudicial para la función, la eliminación del resto de asparagina glicosilado eliminaría el sitio de glicosilación y podría producirse una proteína aglicosilada homogénea.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sintetizar un dominio sencillo-grupo efector (dAb-grupo efector) adecuado para uso *in vivo*, que comprende las etapas de:
  - (a) seleccionar un dominio variable sencillo de anticuerpo que tiene una especificidad de unión a epítope; y
  - (b) unir el dominio sencillo de la etapa (a) a una o más regiones constantes de anticuerpo y/o una región de bisagra (un grupo efector), en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo es un dominio variable de cadena ligera.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena ligera es un miembro del subgrupo de dominios  $V_L$ .
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena ligera es un miembro del subgrupo de dominios  $V_L$ .
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el grupo efector comprende uno cualquiera o más de los grupos seleccionados del grupo constituido por: una región constante de cadena ligera de anticuerpo ( $C_L$ ), un dominio de cadena pesada CH1 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH3 de anticuerpo, una región Fc de un anticuerpo y una región de bisagra de una molécula de anticuerpo.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el grupo efector constituye una región Fc de un anticuerpo.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el grupo efector está constituido por un dominio CH2 y CH3.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el grupo efector está constituido por un dominio CH2, un dominio CH3 y la región de bisagra de una molécula de anticuerpo.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo es un dominio variable que no es de camélido.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo comprende una o más regiones flanqueantes humanas.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo comprende cuatro regiones flanqueantes, según se definen por Kabat, que proceden de un ser humano.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que una o más de las regiones flanqueantes humanas definidas por Kabat son idénticas a nivel de los aminoácidos a las codificadas por genes de anticuerpo de la línea germinal humana.
12. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo es un dominio variable humano.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo no se ha generado en un animal.
14. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo se une al superantígeno proteína L.
15. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el grupo efector es de origen humano o de camélido.
16. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el dominio variable sencillo comprende uno o más regiones flanqueantes humanas y el grupo efector de inmunoglobulina es de origen humano.
17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el dominio variable sencillo comprende cuatro regiones flanqueantes humanas y el grupo efector de inmunoglobulina es de origen humano.
18. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la unión del dominio variable sencillo al grupo efector en la etapa (b) se efectúa por expresión del dominio sencillo-grupo efector como un polipéptido de fusión.



## ES 2 346 431 T3

19. Un dAb-grupo efector adecuado para uso *in vivo*, que comprende un dominio variable sencillo de anticuerpo que tiene una especificidad de unión a epítipo unido a una o más regiones constantes de anticuerpo y/o una región de bisagra (un grupo efector), en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo es un dominio variable de cadena ligera.
20. Un dAb-grupo efector para su uso como un medicamento, en el que dAb es un dominio variable sencillo de cadena ligera y el grupo efector es una o más regiones constantes de anticuerpo y/o región de bisagra.
21. Un dAb-grupo efector de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el dominio variable de cadena ligera es un miembro del subgrupo de dominios  $V_k$ .
22. Un dAb-grupo efector de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el dominio variable de cadena ligera es un miembro del subgrupo de dominios  $V_\lambda$ .
23. Un dAb-grupo efector de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 22, en el que el grupo efector comprende uno cualquiera o más de los grupos seleccionados del grupo constituido por: una región constante de cadena ligera de anticuerpo ( $C_L$ ) y dominio de cadena pesada CH1 de anticuerpo, y dominio de cadena pesada CH2 de anticuerpo, un dominio de cadena pesada CH3 de anticuerpo, una región Fc de un anticuerpo y una región de bisagra de una molécula de anticuerpo.
24. Un dAb-grupo efector de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el grupo efector está constituido por un dominio CH2 y CH3.
25. Un dAb-grupo efector de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el grupo efector está constituido por un dominio CH2, un dominio CH3 y la región de bisagra de una molécula de anticuerpo.
26. Un dAb-grupo efector de acuerdo con las reivindicaciones 20 a 23, en el que el grupo efector constituye una región Fc de un anticuerpo.
27. Un dAb-grupo efector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo comprende regiones flanqueantes humanas.
28. Un dAb-grupo efector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, en el que el dominio variable de cadena sencilla de anticuerpo es de origen humano.
29. Un dAb-grupo efector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 28, en el que grupo efector es de origen humano o de camélido.
30. Un dAb-grupo efector de acuerdo con cualquier a de las reivindicaciones 19 a 29, en el que el dominio variable sencillo comprende una o más regiones flanqueantes humanas y el grupo efector de inmunoglobulina es de origen humano.
31. Dos o más dAb-grupos efectores que comprenden al menos un dAb-grupo efector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, proporcionado como una estructura de orden superior seleccionada del grupo constituido por los siguientes: dímeros, trímeros y multímeros.
32. Dos dAb-grupos efectores de acuerdo con la reivindicación 31, proporcionados como un heterodímero o un homodímero.
33. Dos dAb-grupos efectores de acuerdo con la reivindicación 32, proporcionados como un homodímero.
34. Una composición que comprende un dAb-grupo efector para su uso como un medicamento, en la que dAb-grupo efector se describe por cualquiera de las estructuras mostradas en la Figura 1 (b) y (g), en la que  $1=VL$  y VL es un dAb de VL.
35. Una composición que comprende un dímero de dAb-grupos efectores como se describe en la reivindicación 34.
36. Una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un dAb-grupo efector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 35.
37. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 36, que codifica además una secuencia de señal para la exportación del dAb y del grupo efector desde el citoplasma de una célula huésped tras su expresión.
38. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 36 o la reivindicación 37.
39. Una célula huésped transfectada con un vector de acuerdo con la reivindicación 38.

## ES 2 346 431 T3

40. Una composición que comprende un dAb-grupo(s) efector(es) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 35 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

41. Una composición de acuerdo con la reivindicación 40, que tiene un  $t^{1/2}$  alfa de 15 minutos o más.

42. Una composición de acuerdo con la reivindicación 40, que tiene un  $t^{1/2}$  alfa de 1 a 6 horas.

43. Una composición de acuerdo con la reivindicación 40, 41 ó 42, que tiene un  $t^{1/2}$  beta de 2,5 horas o más.

44. Una composición de acuerdo con la reivindicación 43, que tiene un  $t^{1/2}$  beta de 1 día o más.

45. Una composición de acuerdo con la reivindicación 43, que tiene un  $t^{1/2}$  beta de 2 días o más.

46. Una composición de acuerdo con la reivindicación 43, que tiene un  $t^{1/2}$  beta de 3 días o más.

47. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 46 que tiene un ABC de 1 mg.min/ml o más.

48. Una composición de acuerdo con la reivindicación 47 que tiene un ABC de 15 a 150 mg.min/ml.

49. El uso de un dAb-grupo efector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 33, o de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 36, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad; en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo (dAb) es un dominio variable de cadena ligera.

50. El uso de un dAb-grupo efector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 33, o de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 35, en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o prevención de una enfermedad inflamatoria en un paciente; en el que el dominio variable sencillo de anticuerpo (dAb) es un dominio variable de cadena ligera.

51. El uso de acuerdo con la reivindicación 50, en el que la enfermedad inflamatoria está mediada por TNF alfa y se selecciona del grupo constituido por las siguientes: artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), esclerosis múltiple, choque séptico, enfermedad de Alzheimer, trombosis coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y nefritis glomerular.

52. El uso de acuerdo con la reivindicación 51, en el que la enfermedad inflamatoria es artritis reumatoide.

53. El uso de acuerdo con la reivindicación 52, en el que el dominio variable sencillo de cadena ligera de anticuerpo (dAb) se une específicamente a TNF alfa.

54. El uso de un dAb-grupo efector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 33 o de una composición de acuerdo con la reivindicación 34 o 35 en la preparación de un medicamento para reducir y/o prevenir y/o suprimir la caquexia en un paciente.

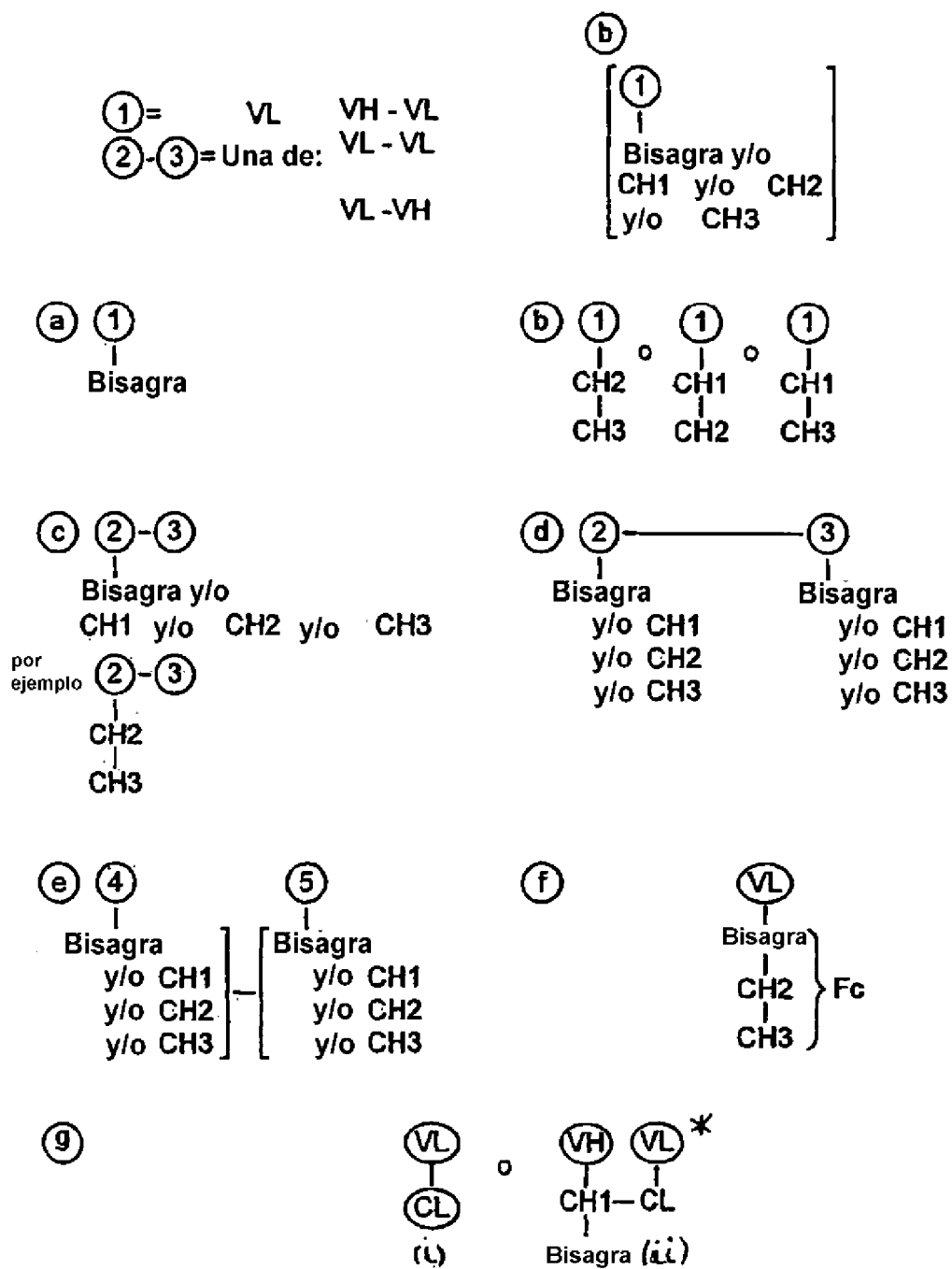
55. Uso de acuerdo con la reivindicación 54, en el que la caquexia está mediada por TNF alfa humano y el paciente es un ser humano.

56. Uso de acuerdo con la reivindicación 54-55, en el que el grupo efector es Fc.

57. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 56, en el que el dAb-grupo efector se administra en un intervalo de dosificación de 0,5 a 20 mg/kg.

58. Uso de acuerdo con la reivindicación 57, en el que el dAb-grupo efector se administra en una dosis de intervalo de 1 a 10 mg/kg.

59. Una composición de acuerdo con la reivindicación 34 que tiene la estructura representada en la Figura 1 (g)(ii), en la que los dominios variables sencillos  $V_H$  y  $V_L$  forman cada uno un sitio de unión a antígeno o epítope respectivo y la especificidad por antígeno o epítope de los dominios variables sencillos es diferente.

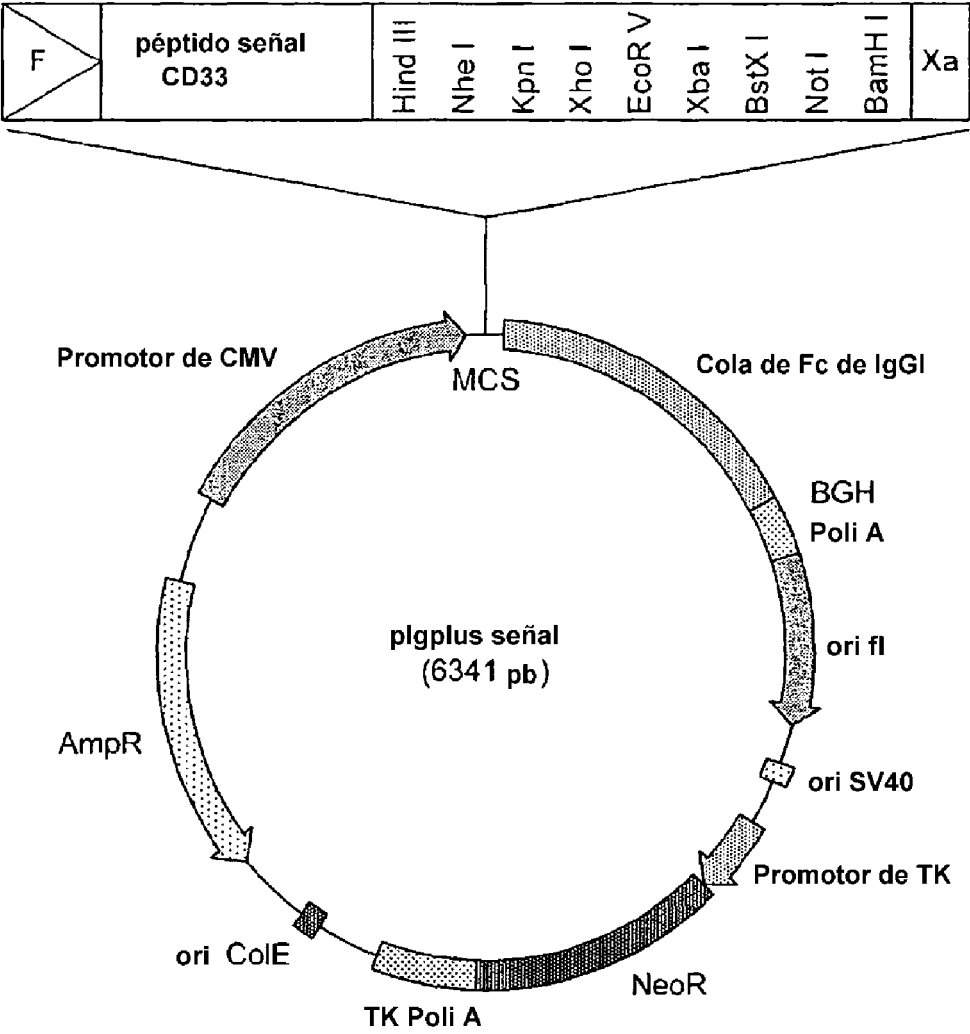


Donde

$\textcircled{4} = \text{VL}$  y  $\textcircled{5} = \text{VL}$ ;  $^{\circ}$

$\textcircled{4} = \text{VL}$  y  $\textcircled{5} = \text{VH}$

FIG. 1



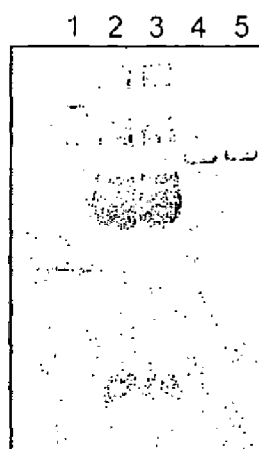
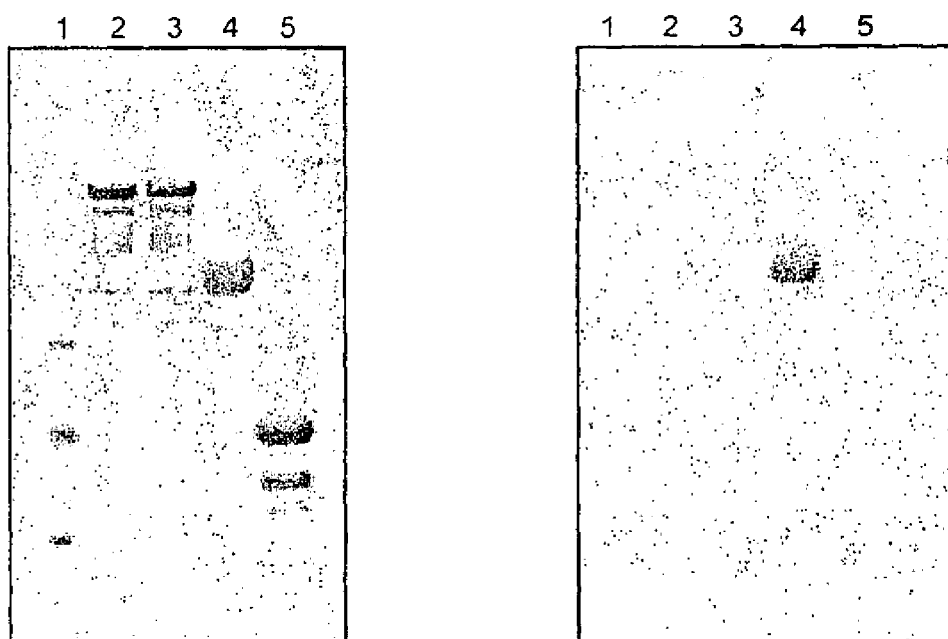


FIG. 3a

Tinción para glicosilación



1. Marcador de PM
2. E5 - FC
3. E5 - FC
4. Control "+" (proteína glicosilada)
5. Control "+" (proteína no glicosilada)

FIG. 3b

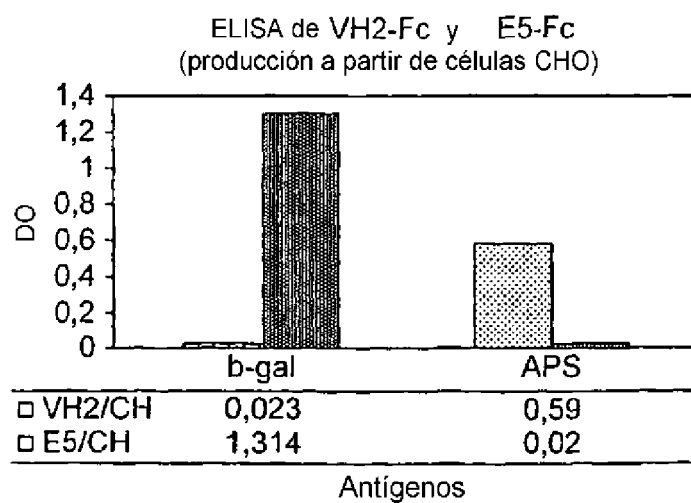
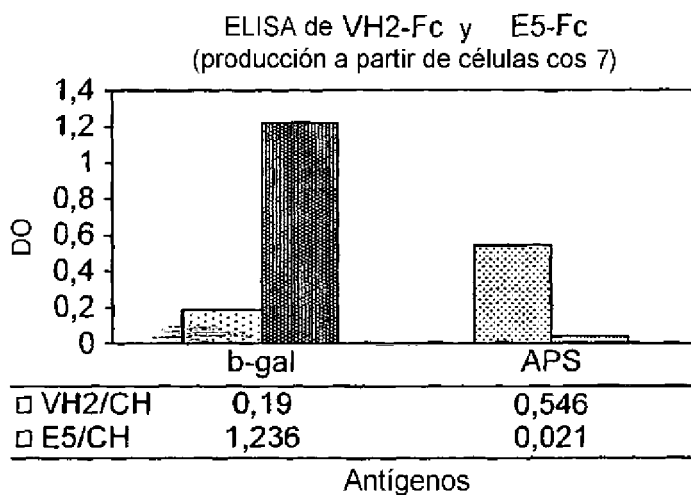
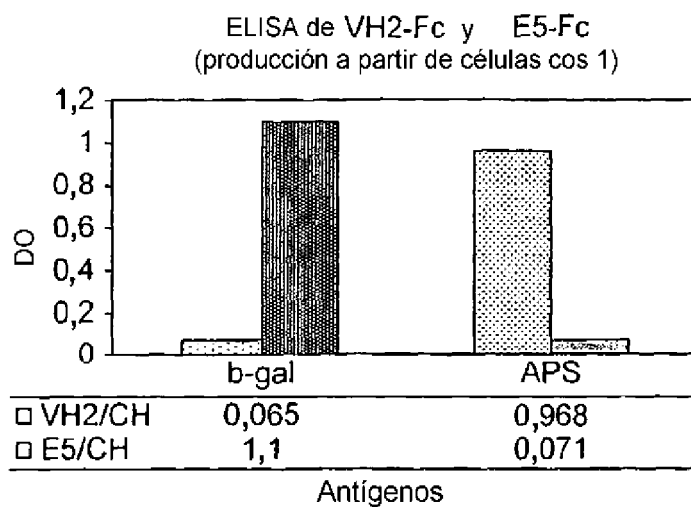
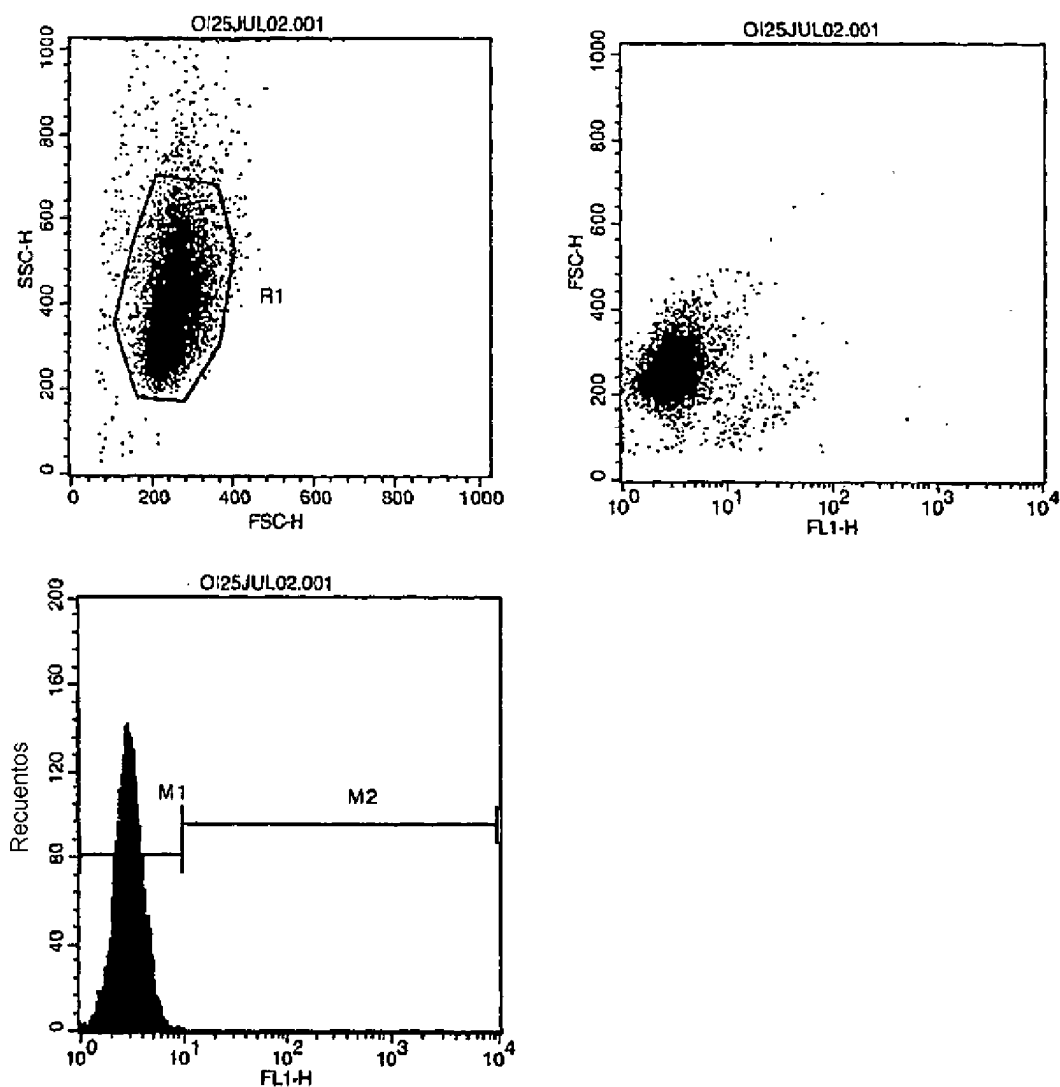


FIG. 3c



Archivo: OI25JUL02.001

Selección: G1

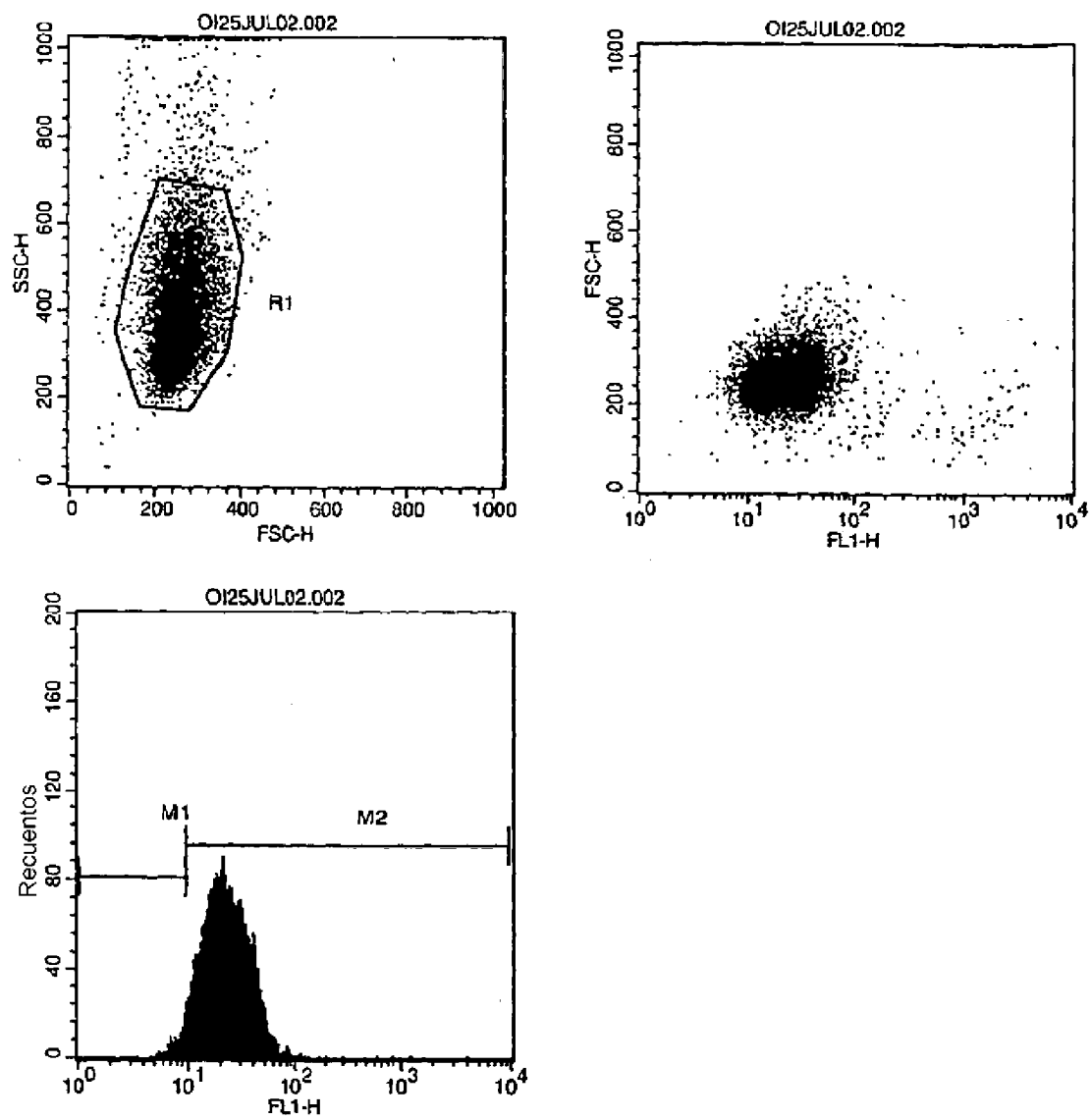
Acontecimientos seleccionados: 9478

Acontecimientos totales: 10000

Parámetros X: FL1-H (Log)

Marcador	Izquierdo,	Derecho	Acontecimientos	% Seleccionados	% Totales	Media
Todos	1,	9910	9478	100,00	94,78	3,03
M1	1,	10	9477	99,99	94,77	3,03
M2	10,	9475	2	0,02	0,02	9,87

FIG. 4a

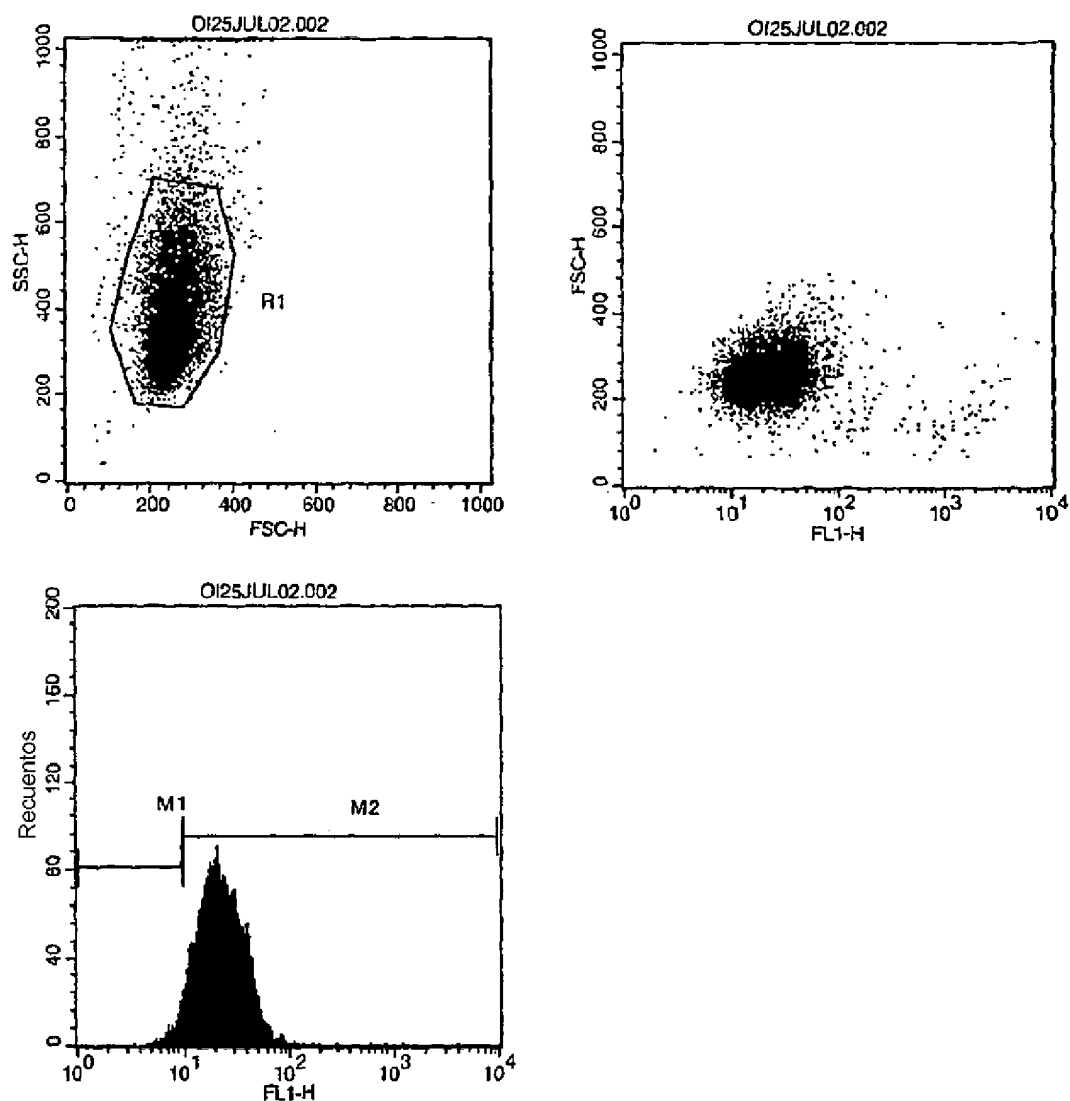


Archivo: OI25JUL02.002                      Selección: G1  
Acontecimientos seleccionados: 9593              Acontecimientos totales: 10000  
Parámetros X: FL1-H (Log)

Marcador	Izquierdo	Derecho	Acontecimientos	% Seleccionados	% Totales	Media
Todos	1,	9910	9593	100,00	95,93	24,80
M1	1,	10	315	3,28	3,15	8,35
M2	10,	9475	9302	96,97	93,02	25,32

FIG. 4b





Archivo: OI25JUL02.002

Selección: G1

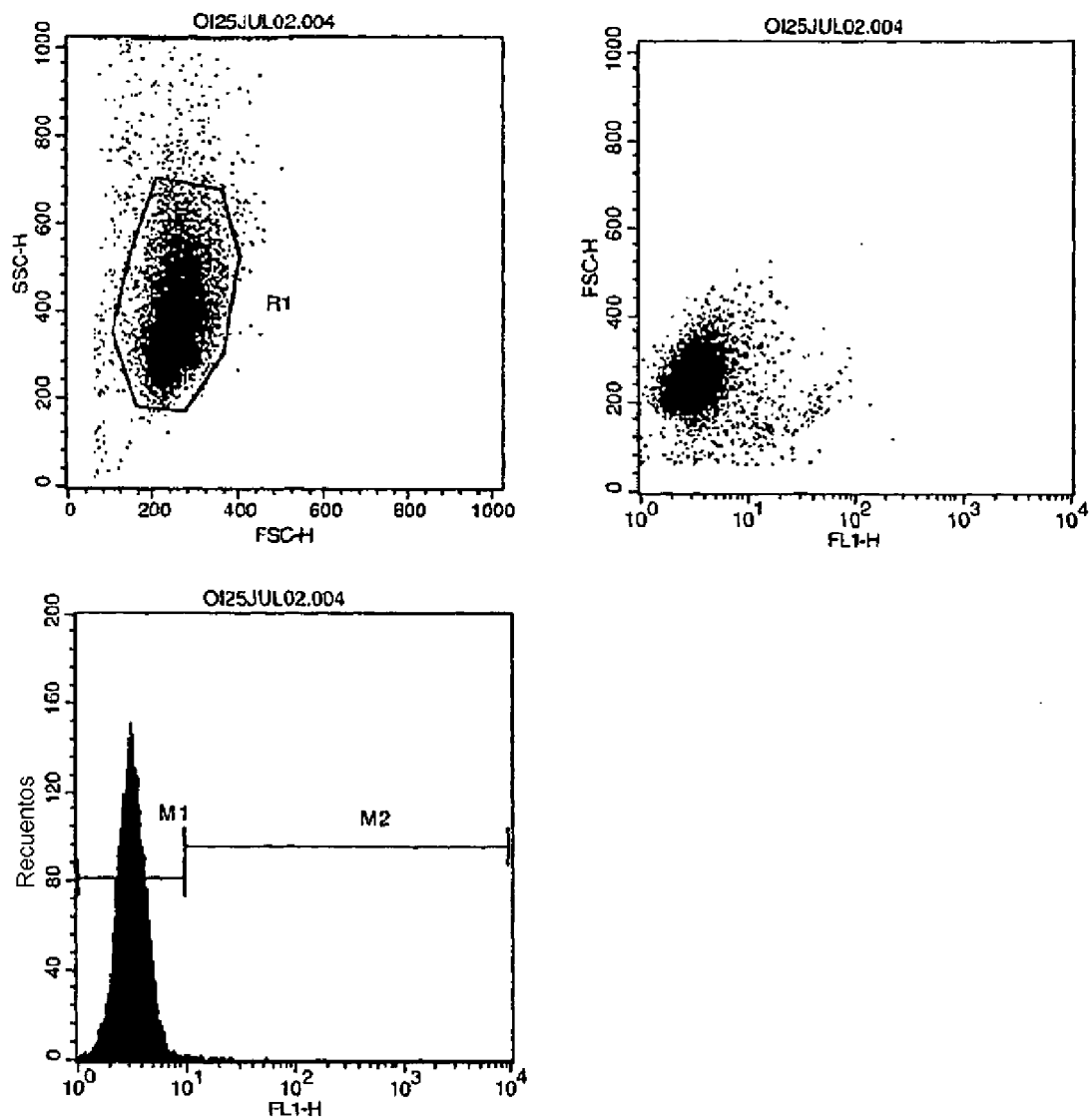
Acontecimientos seleccionados: 9593

Acontecimientos totales: 10000

Parámetros X: FL1-H (Log)

Marcador	Izquierdo	Derecho	Acontecimientos	% Seleccionados	% Totales	Media
Todos	1,	9910	9593	100,00	95,93	24,80
M1	1,	10	315	3,28	3,15	8,35
M2	10,	9475	9302	96,97	93,02	25,32

FIG. 4c



Archivo: OI25JUL02.004

Selección: G1

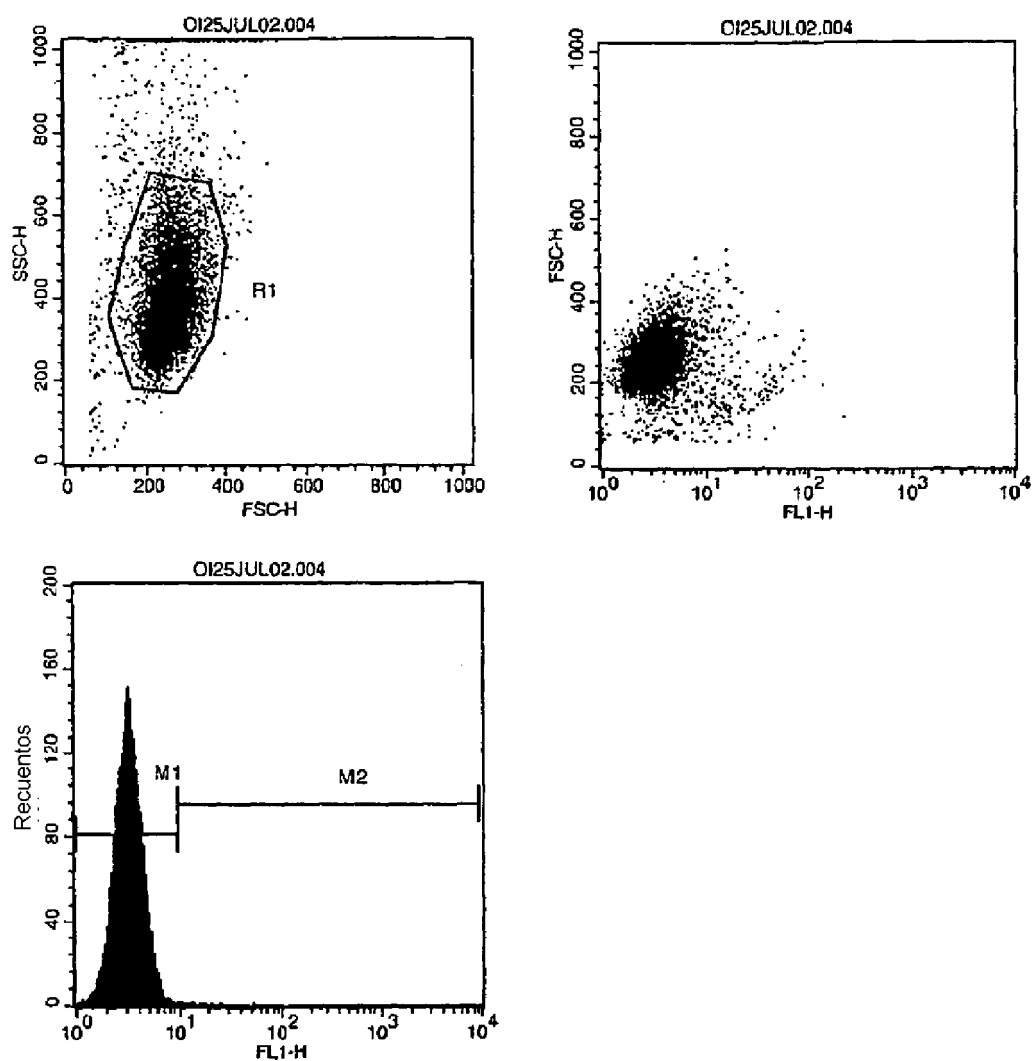
Acontecimientos seleccionados: 9459

Acontecimientos totales: 10000

Parámetros X: FL1-H (Log)

Marcador	Izquierdo	Derecho	Acontecimientos	% Seleccionados	% Totales	Media
Todos	1,	9910	9459	100,00	94,59	3,31
M1	1,	10	9425	99,64	94,25	3,26
M2	10,	9475	34	0,36	0,34	15,67

FIG. 4d



Archivo: OI25JUL02.004

Selección: G1

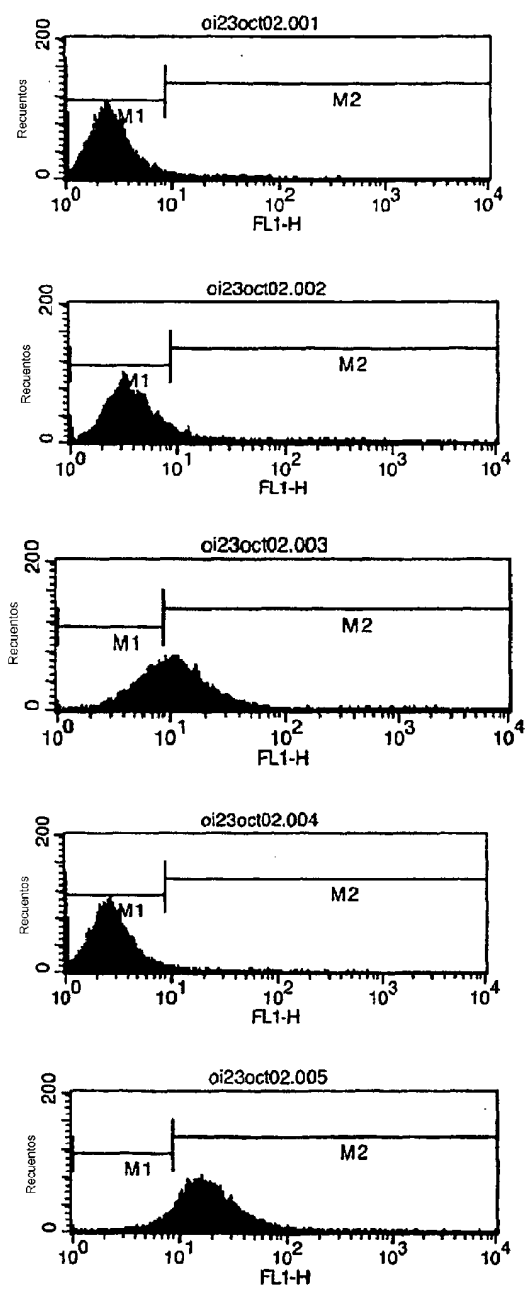
Acontecimientos seleccionados: 9459

Acontecimientos totales: 10000

Parámetros X: FL1-H (Log)

Marcador	Izquierdo	Derecho	Acontecimientos	% Seleccionados	% Totales	Media
Todos	1,	9910	9459	100,00	94,59	3,31
M1	1,	10	9425	99,64	94,25	3,26
M2	10,	9475	34	0,36	0,34	15,67

FIG. 4e



Estadísticas del Histograma

Archivo: oi23oct02.001

Marcador	Acontecimientos	% Totales
Todos	10000	100,00
M1	9659	96,59
M2	350	3,50

Estadísticas del Histograma

Archivo: oi23oct02.002

Marcador	Acontecimientos	% Totales
Todos	10000	100,00
M1	8839	88,39
M2	1178	11,78

Estadísticas del Histograma

Archivo: oi23oct02.003

Marcador	Acontecimientos	% Totales
Todos	10000	100,00
M1	3949	39,49
M2	6103	61,03

Estadísticas del Histograma

Archivo: oi23oct02.004

Marcador	Acontecimientos	% Totales
Todos	10000	100,00
M1	9655	96,55
M2	352	3,52

Estadísticas del Histograma

Archivo: oi23oct02.005

Marcador	Acontecimientos	% Totales
Todos	10000	100,00
M1	994	9,94
M2	9035	90,35

FIG. 5

Niveles en suero de Hel-4 y E5-Fc en ratones después de dosis i.v. en embolada de 50  $\mu$ g

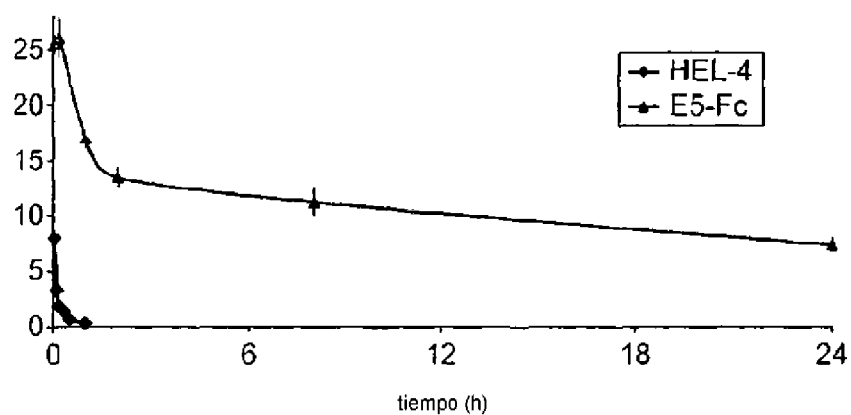


FIG. 6

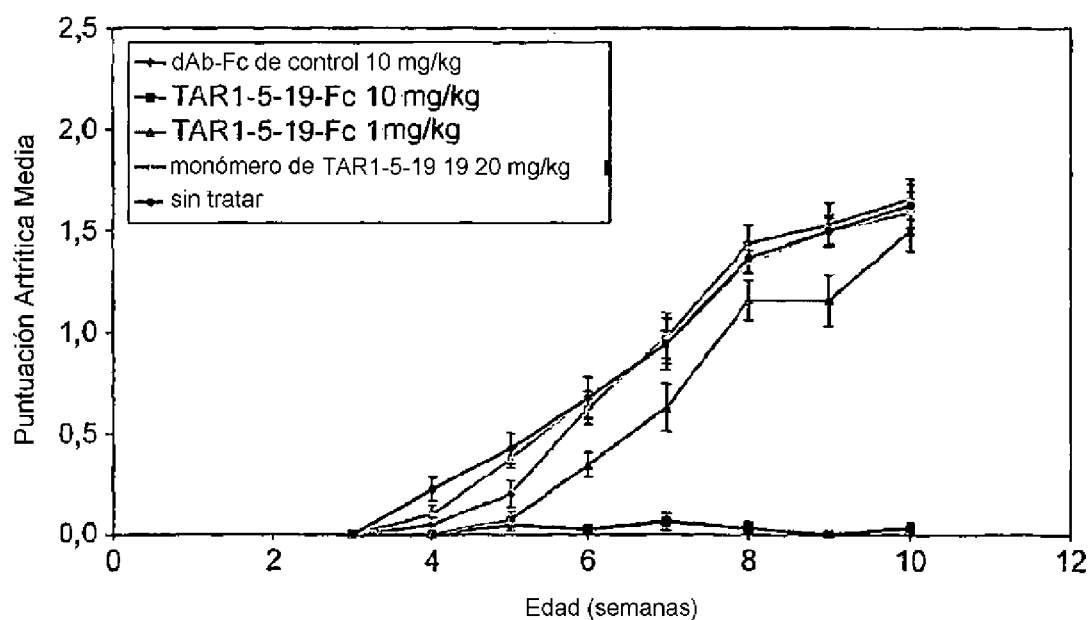


FIG. 7

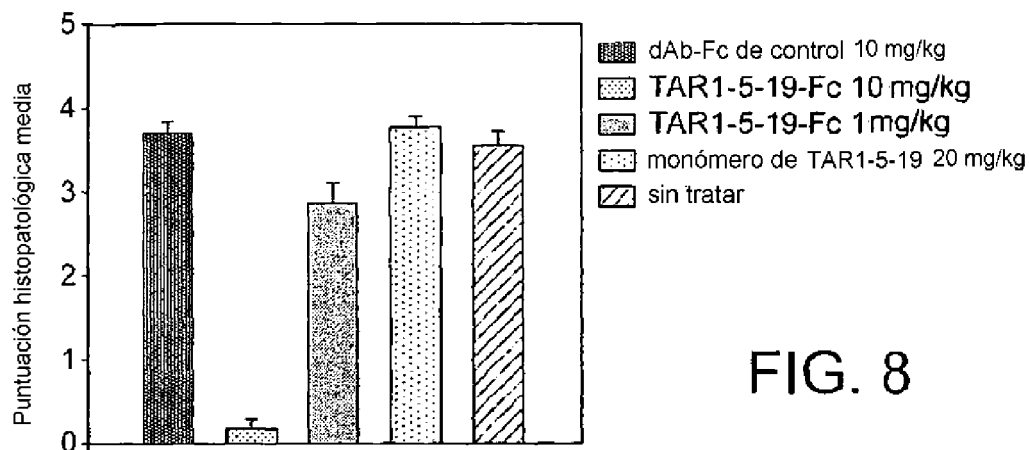


FIG. 8

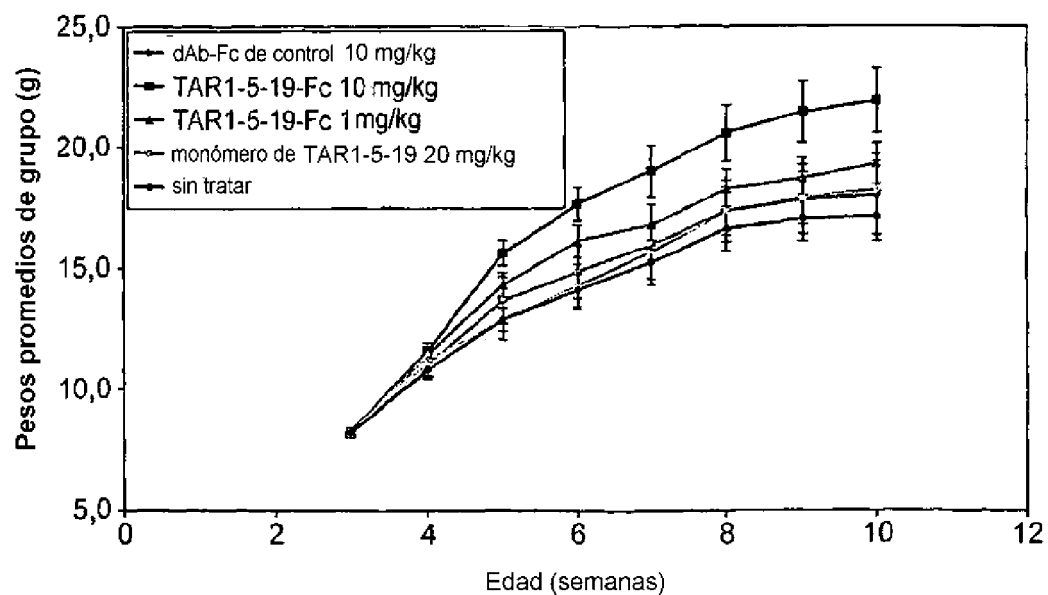


FIG. 9

ATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGT  
 CAACACTACAACAGAAGATGAAACGGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATT  
 TAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTT  
 ATAAATACTACTATTGCCAGCATTTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGA  
 CATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTT  
 GCCGGGCAAGTCAGAGCATTGATAGTTATTTACATTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCT  
 AAGCTCCTGATCTATAGTGCATCCGAGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG  
 ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT  
 GTCAACAGGTTGTGTGGCGTCCTTTTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCG  
 GCCGCGGATCCCATCGAAGGTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTATCCCAAATCTTGTGACAAACCTCA  
 CACATGCCCCTGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA  
 AACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGGACGTGAGC  
 CACGAAGACCCGTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC  
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCCTCACCCTCTGCACC  
 AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC  
 GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC  
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG  
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGGCCACGCTTCCCGTG  
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA  
 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC  
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATGAGAAATC

FIG. 10

MRFPSIFTAVLF~~FAASSALAAPVNTT~~TEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFD~~VAVL~~PFSNSTNNGLLF  
 INTT~~IASIAAKEEGVSLEKREDIQMTQSPSSLSASV~~GDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAP  
 KLLIYSASELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT~~ISSLPEDFATYYCQQV~~WRPFTFGQGTKEIKRA  
 AADPIEGRGGGGGDPKSCDKPHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS  
 HEDPEVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT~~VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI~~  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPV  
 L~~SDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de dAb de factor alfa-Fc según está  
 codificada por la secuencia anterior:  
 está subrayada la secuencia del líder del factor de conjugación alfa de levadura. Está en  
 cursiva la secuencia del dAb. La porción Fc está negrita. El dAb y la región Fc están  
 separados por un espaciador polipeptídico, conteniendo en este caso un sitio de escisión de  
 proteasa del factor Xa

FIG. 11

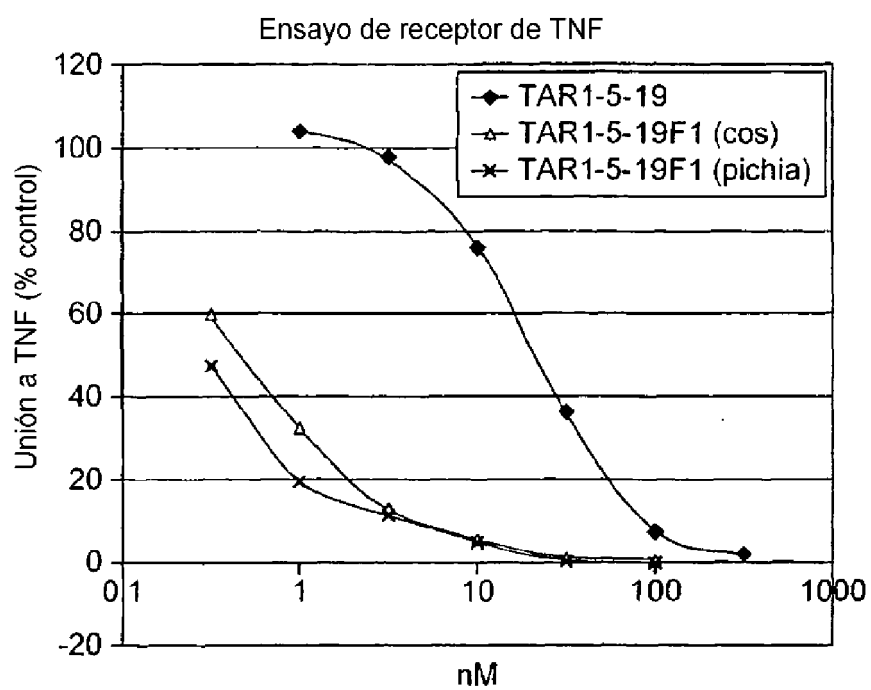


FIG. 12

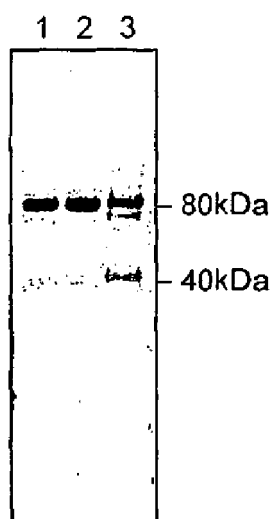


FIG. 13