CONSTRUCTOS DE ANTICUERPO MULTIESPECÍFICO

La presente divulgación se refiere a algunos constructos de anticuerpo multi-específico, a formulaciones que comprenden el constructo, ADN que codifica los constructos y vectores que comprenden los mismos. La divulgación también se extiende a un método para expresar los constructos, por ejemplo en una célula hospedera y a métodos para formular los mismos como una composición farmacéutica. La divulgación también se refiere al uso de constructos de anticuerpo multi-específico y a formulaciones en tratamiento.

Existe un número de estrategias para generar anticuerpos bi-específicos, muchos de los cuales se basan en un formato descrito originalmente por Morrison *et al* (Coloma y Morrison 1997, Nat Biotechnol. 15, 159-163) que incluye la fusión de fragmentos de variable de cadena sencilla (scFv) con anticuerpos enteros, por ejemplo IgG, o con fragmentos Fab de anticuerpo, Schoonjans *et al*., 2000, Journal of Immunology, 165, 7050-7057.

En el caso de Fab-scFv, los dominios V_H y V_L de los scFvs utilizados en tales moléculas bi-específicas y tri-específicas habitualmente se sostienen juntas mediante conectores peptídicos. Sin embargo, para ciertas combinaciones de dominios variables V_H y V_L, los conectores peptídicos son incapaces de conferir suficiente estabilidad al scFv, lo que da lugar a 'respiración' de dominio variable y emparejamiento intermolecular promiscuo con dominios variables y, por lo tanto, una tendencia a formar multímeros a través de la porción Fv de cadena sencilla de los mismos. Esto se ilustra en la Figura 1 en el contexto de una molécula bi-específica.

Los presentes inventores han rediseñado las moléculas de anticuerpo multi-específico involucradas para proporcionar moléculas de anticuerpo con funcionalidad equivalente mientras que se minimiza la multimerización en la etapa de expresión y/o post-purificación. Esto facilita incrementar el rendimiento de material "monomérico" obtenido y proporciona moléculas de estabilidad adecuada para usar en el tratamiento después de purificación, concentración y formulación.

Por lo tanto, en un aspecto se proporciona una molécula de anticuerpo multi-específico que comprende o consiste en:

a) una cadena de polipéptido de fórmula (**I**):

$$\mathbf{V_H\text{-}CH_1\text{-}X\text{-}V_1;\ and}$$

b) una cadena de polipéptido de fórmula (**II**):

$$\mathbf{V_L\text{-}C_L\text{-}Y\text{-}V_2};$$

en las cuales:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

CH_1 representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o un conector;

Y representa un enlace o un conector;

V_1 representa una dsFv, una sdAb, una scFv o una dsscFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V_2 representa dsFv, una sdAb, una scFv o una dsscFv;

en cuyo caso al menos una de V_1 o V_2 es una dsFv o dsscFv.

De manera ventajosa, las moléculas de anticuerpo multi-específico de la presente divulgación minimizan la cantidad de agregación vista después de purificación y maximizan la cantidad de monómero en las formulaciones del constructo a concentraciones farmacéuticas que incluyen mantener altos niveles de monómero en el tiempo al almacenar, por ejemplo el monómero puede estar presente como 50%, 60%, 70% o 75% o más, tal como 80 o 90% o más tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% o más de la proteína total.

Descripción detallada de la invención

"Anticuerpo multi-específico" tal como se emplea en la presente se refiere a una molécula de anticuerpo como se describe en la presente que tiene dos o más dominios de enlace, por ejemplo dos o tres dominios de enlace.

En una forma de realización el constructo de anticuerpo es un anticuerpo tri-específico.

"Anticuerpo tri-específico" tal como se emplea en la presente se refiere a una moléculas de anticuerpo con tres sitios de enlace de antígeno, que pueden enlazar independientemente los mismos antígenos o diferentes antígenos. En un ejemplo, una molécula de anticuerpo anticuerpo triespecífico enlazados antígenos diferentes, es decir que dos sitios de enlazamiento enlazan el mismo antígeno y el tercer sitio de enlazamiento enlazan a un segundo antígeno diferente. Preferiblemente los tres sitios de enlazamiento de una molécula de anticuerpo triespecífico de la invención enlazan independientemente tres antígenos diferentes.

En una forma de realización el constructo es un anticuerpo bi-específico.

"Molécula bi-específica" tal como se emplea en la presente se refiere a una molécula con dos sitios de enlazamiento de antígeno que pueden enlazar los mismos antígenos o diferentes antígenos.

En una forma de realización todos los dominios enlazan el mismo antígeno, incluyendo enlazar el mismo epítope en el antígeno o enlazar diferentes epítope es en el antígeno.

En una forma de realización hay tres dominios de enlazamiento y cada uno de los tres dominios de enlazamiento enlaza diferentes antígenos (distintos).

En una forma de realización hay tres dominios de enlazamiento y dos dominios de enlazamiento enlazan el mismo antígeno, incluyendo el enlazamiento del mismo epítope o diferentes epítopes en el mismo antígeno, y el tercer dominio de enlazamiento enlaza una antígeno diferente (distintos).

"Sitio de enlazamiento de antígeno" tal como se emplea en la presente se refiere a una porción de la molécula que comprende un par de regiones variables, en particular un par cognado que interactúa de manera específica con el antígeno diana.

Los dominios de enlazamiento tal como se emplean en la presente incluyen un anticuerpo de dominio sencillo, es decir una región variable y sitios de enlazamiento de antígeno.

"Específicamente" tal como se emplea en la presente tiene propósito de referirse a un sitio de enlazamiento o un dominio de enlazamiento que sólo reconoce el antígeno para el cual es específico o un sitio de enlazamiento o dominio de enlazamiento que tiene una afinidad de enlazamiento significativamente superior hacia la antígeno para el cual es específico en comparación con la afinidad a antígenos para los cuales no es específico, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces de afinidad superior de enlazamiento.

La afinidad de enlazamiento puede medirse mediante un ensayo estándar, por ejemplo resonancia plasmónica, tal como BIAcore.

En una forma de realización, la molécula de anticuerpo multi-específico de acuerdo con la presente divulgación se proporciona como un dímero de una cadena pesada y ligera de:

Fórmula **(I)** y **(II)** respectivamente, en las cuales la porción V_H-CH_1 junto con la porción V_L-C_L forman un fragmento funcional Fab o Fab'.

V_H representa un dominio variable, por ejemplo un dominio variable de cadena pesada. En una forma de realización V_H representa un dominio variable de cadena pesada. En una forma de realización V_H es un dominio variable quimérico, es decir que comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo un marco humano y CDRs no humanos. En una forma de realización V_H es humanizado. En una forma de realización el V_H es humano.

V_L representa un dominio variable, por ejemplo un dominio variable de cadena ligera. En una forma de realización V_L representa un dominio variable de cadena ligera. En una forma de realización V_L es un dominio variable quimérico, es decir que comprende componentes derivados de al menos dos especies, por ejemplo un marco humano y CDRs no humanos. En una forma de realización V_L es humanizado. En una forma de realización V_H es humanizado. En una forma de realización el V_H es humano

Generalmente V_H y V_L forman conjuntamente un dominio de enlazamiento de antígeno. En una forma de realización V_H y V_L forman un par cognado.

"Par cognado" tal como se emplea en la presente se refiere a un par de dominios variables de un anticuerpo sencillo que fue generado *in vivo*, es decir el emparejamiento de los dominios variables aislados de un hospedero y que ocurre naturalmente. Un par cognado es por lo tanto un par de V_H y V_L. En un ejemplo el par cognado enlaza el antígeno de manera co-operativa.

"Región variable" tal como se emplea en la presente se refiere a la región en una cadena de anticuerpo que comprende los CDRs y un marco, en particular un marco adecuado.

Regiones variables para uso en la presente divulgación serán derivadas por lo general de un anticuerpo que puede generarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

"Derivado de" tal como se emplea en la presente se refiere al hecho de que la secuencia empleada o una secuencia altamente similar a la secuencia empleada fue obtenida a partir del material genético original, tal como la cadena ligera o pesada de un anticuerpo.

"Altamente similar" tal como se emplea en la presente tiene el propósito de referirse a una secuencia de aminoácidos que es similar en 95% en toda su longitud completa o más, tal como 96, 97, 98 o 99% de similitud.

La regiones variables para usar en la presente invención, tal como se han descrito en la presente para V_H y V_L pueden ser de cualquier fuente adecuada y pueden ser, por ejemplo, completamente humanas o humanizadas.

En una forma de realización el dominio de enlazamiento formado por V_H y V_L es específico para un primer antígeno.

En una forma de realización el dominio de enlazamiento formado por V_1 es específico para un segundo antígeno.

En una forma de realización el dominio de enlazamiento formado por V_2 es específico para un segundo o un tercer antígeno.

En una forma de realización el dominio CH_1 es un dominio 1 que ocurre naturalmente de una cadena pesada de anticuerpo o un derivado de la misma.

En una forma de realización el fragmento C_L, en la cadena ligera, es una secuencia kappa constante o una secuencia lambda constante o un derivado de las mismas.

Un derivado de un dominio que ocurre naturalmente, tal como se emplea en la presente tiene el propósito de referirse a donde uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia que ocurre naturalmente han sido reemplazados o suprimidos, por ejemplo para optimizar las propiedades del dominio tal como eliminando propiedades indeseables pero en cuyo caso se retiene(n) el o los rasgos característicos del dominio.

En una forma de realización una o más enlaces de disulfuro de inter-cadena (es decir inter cadena ligera y pesada) naturales o diseñados se encuentran presentes en el fragmento funcional Fab o Fab'.

En una forma de realización un enlace de disulfuro "natural" se encuentra presente entre un CH_1 y C_L en las cadenas de polipéptido de fórmula **(I)** y **(II)**.

Cuando el dominio C_L se deriva de Kappa o de Lambda la posición natural para un enlace que forma cisteína es 214 en cKappa y cLambda humanos (numeración Kabat 4ª edición 1987).

La ubicación exacta del enlace de disulfuro que forma cisteína en CH_1 depende del dominio particular que se emplea en realidad. De esta manera, por ejemplo en gamma-1 humano la posición natural del enlace de disulfuro se localiza en la posición 233 (numeración Kabat 4ª edición 1987). La posición del enlace que forma cisteína para otros isótopos humanos tal como gamma 2, 3, 4, IgM y IgD son conocidos, por ejemplo la posición 127 para IgM, IgE, IgG2, IgG3, IgG4 humanas y 128 de la cadena pesada de IgD y IgA2B humanas.

Opcionalmente puede haber un enlace de disulfuro entre los V_H y V_L de los polipéptidos de fórmula I y II.

En una forma de realización el anticuerpo multi-específico de acuerdo con la divulgación tiene un enlace disulfuro en una posición equivalente o correspondiente a la que ocurre naturalmente entre CH_1 y C_L.

En una forma de realización una región constante que comprende CH_1 y una región constante tal como C_L tiene un enlace de disulfuro que se encuentra en una posición que ocurre de manera no natural. Esto puede diseñarse en la molécula introduciendo cisteína(s) en la cadena de aminoácidos en la posición o las posiciones requeridas. Este enlace de disulfuro no natural se encuentra presente en adición a o como una alternativa al enlace de disulfuro natural entre CH_1 y C_L. La(s) cisteína(s) en posiciones naturales pueden reemplazarse por un aminoácido tal como serina que es incapaz de formar un puente de disulfuro.

La introducción de cisteínas diseñadas puede efectuarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis de solapamiento por extensión PCR, mutagénesis dirigida a un sitio o mutagénesis de casete (véase, en términos generales, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida a un sitio se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo QuikChange® kit de mutagénesis dirigida a un sitio (Stratagene, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete puede efectuarse con base en Wells *et al*., 1985, Gene, 34:315-323. De

modo alternativo pueden hacerse mutantes mediante síntesis génica total por hibridación, ligazón y amplificación de PCR y clonación de oligonucleótidos de superposición.

En una forma de realización un enlace de disulfuro entre CH_1 y C_L se encuentra completamente ausente; por ejemplo, las cisteínas entre cadenas pueden reemplazarse por otro aminoácido, tal como serina. De esta manera, en una forma de realización no hay enlaces de disulfuro entre cadenas en el fragmento Fab funcional de la molécula. Divulgaciones como WO2005/003170, incorporada a la presente por referencia, describen cómo proporcionar fragmentos de Fab sin un enlace de disulfuro entre cadenas.

V_1 representa un dsFv, un sdAb, un scFv, o un dsscFv, por ejemplo un dsFv, scFv o un dsscFv.

V_2 representa un dsFv, un sdAb, un scFv, o un dsscFv, por ejemplo un dsFv, scFv o un dsscFv.

En una forma de realización, V_1 y V_2 son ambos dsscFv.

En una forma de realización, V_1 y V_2 son ambos dsFv. Cuando ambos V_1 y V_2 son dsFv, cualquiera de los dominios variables V_H o V_L son iguales para V_1 y V_2. En una forma de realización, V_1 y V_2 tienen el mismo dominio variable V_H. En otra forma de realización, V_1 y V_2 tienen el mismo dominio variable V_L. En una forma de realización los dominios variables V_H y V_L son iguales para V_1 y V_2. Esto último permite reticulación, lo cual puede ser deseable para algunas dianas.

En una forma de realización V_1 es un dsFv y V_2 es un scFv. En una forma de realización V_1 es un scFv y V_2 es un dsFv. En una forma de realización V_1 es un dsscFv y V_2 es un dsFv. En una forma de realización V_1 es un dsFv y V_2 es un dsscFv. En una forma de realización V_1 es un dsscFv y V_2 es un scFv. En una forma de realización V_1 es un scFv y V_2 es un dsscFv. En una forma de realización, V_1 no es un scFv. En una forma de realización, V_2 no es un scFv. En una forma de realización, tanto V_1 como V_2 no son scFv.

De esta manera, en un aspecto, se proporciona una molécula de anticuerpo multi-específico que comprende o consiste en:

a) una cadena de polipéptido de fórmula (**I**):

$$\mathbf{V_H\text{-}CH_1\text{-}X\text{-}V_1;}\ \text{y}$$

b) una cadena de polipéptido de fórmula (**II**):

$$\mathbf{V_L\text{-}C_L\text{-}Y\text{-}V_2;}$$

en las cuales:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

CH_1 representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o un conector;

Y representa un enlace o un conector;

V_1 representa un dsFv o un dsscFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

C_L representa un dominio de una región constante, por ejemplo un dominio de región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V_2 representa dsFv o un dsscFv;

"Fragmento variable de cadena sencilla" o "scFv" tal como se emplea en la presente se refiere a fragmento variable de cadena sencilla que comprende o consiste en un dominio

variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que se estabiliza por un conector de péptido entre los dominios variables V_H y V_L. Los dominios variables V_H y V_L pueden estar en cualquier orientación adecuada, por ejemplo el C-terminal de V_H puede estar conectado con el N-terminal de V_L o el C-terminal de V_L puede estar conectado con el N-terminal de V_H.

"Fragmento variable de cadena sencilla estabilizada con disulfuro" o "dsscFv" tal como se emplea en la presente se refiere a fragmento variable de cadena sencilla que se estabiliza mediante un conector de péptido entre los dominios variables de V_H y V_L y también incluye un enlace de disulfuro entre dominios entre V_H y V_L.

"Fragmento variable estabilizado con disulfuro" o "dsFv" tal como se emplea en la presente se refieren a fragmento variable de cadena sencilla que no incluye un conector de péptido entre los dominios variables de V_H y V_L y a cambio se estabiliza por un enlace de disulfuro entre dominios entre V_H y V_L.

"Anticuerpo de dominio sencillo" o "sdAb" tal como se emplea en la presente se refiere a fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio de anticuerpo variable monomérico sencillo, tal como V_H o V_L o VHH.

En una forma de realización, cuando V_1 y/o V_2 son un dsFv o un dsscFv, el enlace de disulfuro entre los dominios variables V_H y V_L de V_1 y/o V_2 se encuentra entre dos de los residuos listados más adelante (a menos que el contexto indique algo diferente, se emplea numeración Kabat en el listado más adelante). Siempre que se hace referencia a la numeración Kabat, la referencia relevante es Kabat *et al*., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departmento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, NIH, EEUU.

En una forma de realización el enlace de disulfuro se encuentra una posición seleccionada del grupo que comprende:

- V_H37 + V_L95C véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);
- V_H44 + V_L100 véase, por ejemplo,; Biochemistry 33 5451-5459 Reiter et al (1994); o Journal of Biological Chemistry Vol. 269 No. 28 pp.18327-18331 Reiter et al (1994); o Protein Engineering, vol.10 no.12 pp.1453-1459 Rajagopal et al (1997);
- V_H44 + V_L105 véase, por ejemplo, J Biochem. 118, 825-831 Luo et al (1995);
- V_H45 + V_L87 véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);
- V_H55 + V_L101 véase, por ejemplo, FEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995);
- V_H100 + V_L50 véase, por ejemplo, Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber et al (1990);
- V_H100b + V_L49;
- V_H98 + V_L 46 véase, por ejemplo, Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997);
- V_H101 + V_L46;
- V_H105 + V_L43 véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 pp.7538-7542 Brinkmann *et al* (1993); o Proteins 19, 35-47 Jung et al (1994),
- V_H106 + V_L57 véase, por ejemplo, FEBS Letters 377 135-139 Young *et al* (1995)

y una posición correspondiente a los mismos en un par de región variable localizado en la molécula.

En una forma de realización, el enlace de disulfuro se forma entre las posiciones V_H44 y V_L100.

Los pares de aminoácidos estados más adelante se encuentran en las posiciones que conducen al reemplazo por cisteína de modo que puedan formarse los enlaces de disulfuro. La cisteína puede diseñarse en estas porciones deseadas mediante técnicas conocidas. Por lo tanto, en una forma de realización una cisteína diseñada de acuerdo con la presente divulgación se refiere a dónde el residuo que ocurren naturalmente en una posición dada de aminoácido ha sido reemplazado con un residuo de cisteína.

La introducción de cisteínas diseñadas puede efectuarse usando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis de superposición por extensión PCR, mutagénesis dirigida a un sitio o mutagénesis de casete (véase, en términos generales, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida a un sitio se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo QuikChange® kit de mutagénesis dirigida a un sitio (Stratagen, La Jolla, CA). La mutagénesis de casete puede realizarse con base en Wells *et al*., 1985, Gene, 34:315-323. De modo alternativo, pueden hacerse mutantes mediante la síntesis génica total por hibridación, ligación y amplificación de PCR y clonación de oligonucleótidos de superposición.

Por consiguiente, en una forma de realización cuando V_1 y/o V_2 son un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_1 y/o los dominios variables V_H y V_L de V_2 pueden conectarse mediante un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína, en cuyo caso la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en: V_H37 y V_L95, V_H44 y V_L100, V_H44 y V_L105, V_H45 y V_L87, V_H100 y V_L50, V_H100b y V_L49, V_H98 y V_L46, V_H101 y V_L46, V_H105 y V_L43 y V_H106 y V_L57.

En una forma de realización, cuando V_1 y/o V_2 son un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_1 y/o los dominios variables V_H y V_L de V_2 pueden estar conectados mediante un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína, uno en V_H y uno en V_L, que están afuera de los CDRs en cuyo caso la posición del par de residuos de cisteína se selecciona del grupo que consiste en V_H37 y V_L95, V_H44 y V_L100, V_H44 y V_L105, V_H45 y V_L87, V_H100 y V_L50, V_H98 y V_L46, V_H105 y V_L43 y V_H106 y V_L57.

En una forma de realización, cuando V_1 es un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_1 están conectados por un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína diseñada, uno en posición V_H44 y el otro en V_L100.

En una forma de realización cuando V_2 es un dsFv o un dsscFv, los dominios variables V_H y V_L de V_2 están conectados por un enlace de disulfuro entre dos residuos de cisteína diseñada, uno en posición V_H44 y el otro en V_L100.

En una forma de realización cuando V_1 es un dsFv, un dsscFv, o un scFv, el dominio V_H de V_1 está conectado con X.

En una forma de realización cuando V_1 es un dsFv, un dsscFv, o un scFv, el dominio V_L de V_1 está conectado con X.

En una forma de realización cuando V_2 es un dsFv, un dsscFv, o un scFv, el dominio V_H de V_2 está conectado con Y.

En una forma de realización cuando V_2 es un dsFv, un dsscFv, o un scFv, el dominio V_L de V_2 está conectado con Y.

La persona experta apreciará que cuando V_1 y/o V_2 representa un dsFv, el anticuerpo multi-específico comprenderá un tercer polipéptido que codifica el correspondiente dominio libre V_H o V_L que no está conectado con X o Y. Cuando V_1 y V_2 son ambos un dsFv entonces el "dominio variable libre" (es decir el dominio conectado por medio de un enlace de disulfuro con el resto del polipéptido) será común a ambas cadenas. De esta manera, mientras que el dominio variable real fundido o conectado por medio de X o Y con el polipéptido puede ser diferente en cada cadena de polipéptido, los dominios variables libres emparejados con el mismo serán generalmente idénticos entre sí.

En una forma de realización X es un enlace.

En una forma de realización Y es un enlace.

En una forma de realización tanto X como Y son enlaces.

En una forma de realización X es un conector, preferiblemente un conector de péptido, por ejemplo un péptido adecuado para conectar las porciones CH_1 y V_1.

En una forma de realización Y es un conector, preferiblemente un conector de péptido, por ejemplo un péptido adecuado para conectar las porciones C_L y V_2.

En una forma de realización tanto X como Y son conectores. En una forma de realización tanto X como Y son conectores de péptido.

El término "conector de péptido"tal como se usen la presente se refiere a un péptido que comprende aminoácidos. Un intervalo de conectores de péptido adecuados es conocido por la persona experta en la técnica.

En una forma de realización el conector de péptido es de 50 aminoácidos de longitud o menos, por ejemplo 20 aminoácidos o menos, tal como aproximadamente 15 aminoácidos o menos, tal como 9, 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos de longitud.

En una forma de realización el conector se selecciona de una secuencia mostrada en la secuencia 1 a 67.

En una forma de realización el conector se selecciona de una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En una forma de realización X tiene la secuencia SGGGGTGGGGS (SEQ ID NO: 1).

En una forma de realización Y tiene la secuencia SGGGGTGGGGS (SEQ ID NO: 1).

En una forma de realización X tiene la secuencia SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2). En una forma de realización Y tiene la secuencia SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 2).

En una forma de realización X tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:1 e Y tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:2.

En una forma de realización X tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:69 o 70. En una forma de realización Y tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:69 o 70. En una forma de realización X tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:69 e Y tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:70.

Tabla 1. Secuencias de conector bisagra

SEQ ID NO:	**SECUENCIA**
3	DKTHTCAA

SEQ ID NO:	SECUENCIA
4	DKTHTCPPCPA
5	DKTHTCPPCPATCPPCPA
6	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
7	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
8	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
9	DKTHTCCVECPPCPA
10	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
11	DKTHTCPSCPA

Tabla 2. Secuencias de conector flexible

SEQ ID NO:	SECUENCIA
12	SGGGGSE
13	DKTHTS
14	(S)GGGGS
15	(S)GGGGSGGGGS
16	(S)GGGGSGGGGSGGGGS
17	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
18	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
19	AAAGSG-GASAS
20	AAAGSG-XGGGS-GASAS
21	AAAGSG-XGGGSXGGGS –GASAS
22	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS –GASAS
23	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
24	AAAGSG-XS-GASAS
25	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
26	ATTTGSSPGPT
27	ATTTGS
-	GS
28	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
29	GTVAAPSVFIFPPSD
30	GGGGIAPSMVGGGGS
31	GGGGKVEGAGGGGGS
32	GGGGSMKSHDGGGGS
33	GGGGNLITIVGGGGS
34	GGGGVVPSLPGGGGS
35	GGEKSIPGGGGS
36	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
37	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
38	TPSHLSHILPSFGLPTFN
39	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
40	SPAAHFPRSIPRPGPIRT

SEQ ID NO:	SECUENCIA
41	APGPSAPSHRSLPSRAFG
42	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
43	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
44	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
45	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
46	LPWRTSLLPSLPLRRRP
47	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
48	VPPAPVVSLRSAHARPPY
49	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
50	PNVAHVLPLLTVPWDNLR
51	CNPLLPLCARSPAVRTFP

(S) es opcional en las secuencias 14 a 18.

Ejemplos de conectores rígidos incluyen las secuencias de péptido GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 52), PPPP (SEQ ID NO: 53) y PPP.

En una forma de realización el conector de péptido es un péptido de enlazamiento de albúmina.

Ejemplos de péptidos de enlazamiento de albúmina se proporcionan en WO2007/106120 e incluyen:

Tabla 3

SEQ ID NO:	SECUENCIA
54	DLCLRDWGCLW
55	DICLPRWGCLW
56	MEDICLPRWGCLWGD
57	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
58	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
59	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
60	EDICLPRWGCLWEDD
61	RLMEDICLPRWGCLWEDD
62	MEDICLPRWGCLWEDD
63	MEDICLPRWGCLWED
64	RLMEDICLARWGCLWEDD
65	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
66	RAPESFVCYWETICFERSEQ
67	EMCYFPGICWM

Ventajosamente el uso de péptidos de enlazamiento de albúmina como un conector puede incrementar la semi-vida de la moléculas de anticuerpo multi-específico.

En una forma de realización cuando V_1 es un scFv o un dsscFv, hay es un conector por ejemplo un péptido adecuado para conectar los dominios variables V_H y V_L de V_1.

En una forma de realización cuando V_2 es un scFv o un dsscFv, hay un conector por ejemplo un péptido adecuado para conectar los dominios variables V_H y V_L de V_2.

En una forma de realización el conector de péptido en el scFv o dsscFv se encuentra en un intervalo alrededor de 12 a 25 aminoácidos de los, tal como 15 a 20 aminoácidos.

En una forma de realización cuando V_1 es un scFv o un dsscFv, el conector que conecta los dominios variables V_H y V_L de V_1 tiene la secuencia GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 68).

En una forma de realización cuando V_2 es un scFv o un dsscFv, el conector que conecta los dominios variables V_H y V_L de V_2 tiene la secuencia GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 68).

En una forma de realización cuando V_1 es un scFv o un dsscFv, el conector que conecta los dominios variables V_H y V_L de V_1 tiene la secuencia SGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69).

En una forma de realización cuando V_2 es un scFv o un dsscFv, el conector que conecta los dominios variables V_H y V_L de V_2 tiene la secuencia SGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69)

En una forma de realización cuando V_1 es un scFv o un dsscFv, el conector que conecta los dominios variables V_H y V_L de V_1 tiene la secuencia SGGGGSGGGGTGGGGS (SEQ ID NO: 70).

En una forma de realización cuando V_2 es un scFv o un dsscFv, el conector que conecta los dominios variables V_H y V_L de V_2 tiene la secuencia SGGGGSGGGGTGGGGS SEQ ID NO: 70).

Por consiguiente, en un aspecto se proporciona una molécula anticuerpo multi-específico, que comprende o consiste en:

a) una cadena de polipéptido de fórmula (**I**):

$$\mathbf{V_H\text{-}CH_1\text{-}X\text{-}V_1;}\ \text{y}$$

b) una cadena de polipéptido de fórmula (**II**):

$$\mathbf{V_L\text{-}C_L\text{-}Y\text{-}V_2;}$$

en las cuales:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

CH_1 representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o un conector;

Y representa un enlace o un conector;

V_1 representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V_2 representa dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv;

en cuyo caso al menos uno de V_1 o V_2 es un dsFv o dsscFv.

La presente divulgación también proporciona secuencias que son 80%, 90%, 91%, 92%, 93% 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% similares a una secuencia divulgada en la presente.

"Identidad", tal como se usa en la presente, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias.

"Similitud", tal como se usa en la presente, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, leucina puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que pueden sustituirse frecuentemente por otro incluyen, pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
-cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad disimilitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, el software BLAST™ está disponible en NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656,).

Los anticuerpos para usar en los constructos multiespecíficos de la presente invención pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Los anticuerpos generados contra un polipéptido antígeno pueden obtenerse donde es necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a animal, preferiblemente a animal no humano, utilizando protocolos bien conocidos y rutinarios; véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden inmunizarse. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas son los más adecuados en términos generales.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al* 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

También pueden generarse anticuerpos usando métodos de anticuerpo de linfocitos sencillo clonando y expresando ADNcs de región variable de inmunoglobulina, generados a partir de linfocitos sencillos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo mediante los métodos descritos por Babcook, J. *et al* 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848l; WO92/02551; WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los anticuerpos para uso en la presente divulgación también pueden generarse utilizando diversos métodos de exposición con fatuos que se conocen en la técnica e incluyen aquellos divulgados por Brinkman *et al*. (in J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames *et al*. (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough *et al.* (Eur. J. Immunol. 1994,

24:952-958), Persic *et al.* (Gene, 1997 187 9-18), Burton *et al.* (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) y WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; y US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743; 5,969,108, y WO20011/30305.

En una forma de realización las moléculas multi-específicas de acuerdo con la divulgación son humanizadas.

Humanizado (lo cual incluye anticuerpos CDR-injertados) tal como se emplea en la presente se refiere a moléculas que tienen una o más regiones que determinan complementaridad (CDRs) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo US 5,585,089; WO91/09967). Se apreciarán que solamente puede ser necesario transferir los residuos que determinan especificidad de las CDRs antes que la CDR entera (véase, por ejemplo,, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Anticuerpos humanizados pueden comprender opcionalmente además uno o más residuos de marco derivados de las especies no humanas a partir de las cuales se derivaron las CDRs.

Tal como se usa en la presente, el término “moléculas de anticuerpo humanizado” se refiere a una moléculas de anticuerpo en la cual la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (incluyendo, si se desea, una o más CDRs modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo un anticuerpo monoclonal de murino) injertado a un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una reseña véase Vaughan *et al*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una forma de realización antes que se transfiera la CDR, se transfieren solamente uno o más de los residuos que determinan especificidad desde cualquiera de las CDRs descritas antes en la presente al marco de anticuerpo humano (véase, por ejemplo,, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). En una forma de realización solamente los residuos que determinan especificidad de una o más de las CDRs descritas antes en la presente se transfieren al marco de anticuerpo humano. En otra forma de realización solamente los residuos que determinan especificidad a partir de cada una de las CDRs descritas antes en la presente se transfieren al marco de anticuerpo humano.

Cuando las CDRs o los residuos que determinan especificidad están injertados, puede usarse cualquier secuencia de marco de región variable aceptora apropiada con respecto a la clase/el tipo del anticuerpo donante del cual se derivaron las CDRs, incluyendo regiones marco de ratón, primate y humano. De manera adecuada, el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marco aceptoras humanas como también una o más de las CDRs proporcionadas en la presente.

Ejemplos de marcos humanos que pueden usarse en la presente divulgación son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM pueden usarse para la cadena pesada, REI puede usarse para la cadena ligera y EU, LAY y POM pueden usarse tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. De modo alternativo, pueden usarse secuencias de línea germinal humana; estas se encuentran disponibles en: http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php.

En una molécula de anticuerpo humanizado de la presente divulgación, las cadenas pesada y ligera del aceptor no necesariamente necesitan derivarse del mismo anticuerpo y, si

se desea, comprenden cadenas compuestas que tienen regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

La regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que aquellas del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales pueden ser cambiados a residuos que ocurren más frecuentemente para aquella clase de tipo de cadena aceptora. De modo alternativo, los residuos seleccionados en la regiones marco del aceptor pueden cambiarse de modo que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann *et al* 1998, Nature, 332, 323-324). Tales cambios deben mantenerse a un mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Un protocolo para seleccionar residuos en las regiones marco del aceptor que pueden necesitar cambiarse se describe en WO91/09967.

Los derivados de marcos pueden tener 1, 2, 3 o 4 aminoácidos reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo con un residuo de donante.

Los residuos de donante son residuos del anticuerpo donante, es decir el anticuerpo del cual se derivaron originalmente las CDRs. Los residuos de donantes pueden reemplazarse por un residuo adecuado derivado de un marco receptor humano (residuos de aceptor).

En una forma de realización, los anticuerpos multi-específicos de la presente divulgación son completamente humanos, en particular uno o más de los dominios variables son completamente humanos.

Moléculas completamente humanas son aquellas en las cuales las regiones variables y las regiones constantes (cuando están presentes) tanto de la cadena pesada como de la ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos por ejemplo por métodos de exposición de fago descritos previamente y anticuerpos producidos por ratones en los cuales la variable de inmunoglobulina de murino y opcionalmente los genes de región constante han sido reemplazados por sus contrapartes humanas, por ejemplo tal como se describe en términos generales en EP0546073, US5,545,806, US5,569,825, US5,625,126, US5,633,425, US5,661,016, US5,770,429, EP 0438474 y EP0463151.

En una forma de realización, las moléculas de anticuerpo multi-específico de la divulgación son capaces de enlazar selectivamente dos, tres o más antígenos diferentes de interés.

En una forma de realización, los antígenos de interés enlazados por el dominio de enlazamiento de antígeno, formado por V_H/V_L, o V_1 o V_2 se seleccionan independientemente de una proteína asociada con la célula, por ejemplo una proteína de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células T, células endoteliales o células tumorales y una proteína soluble.

Antígenos de interés también puede ser cualquier proteína relevante en la medicina tal como aquellas proteínas aumentadas durante una enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos particulares de antígenos incluyen receptores superficiales de célula, tales como receptores de señalización de célula T o de célula B, moléculas co-estimuladoras, inhibidores de punto de control, receptores de células asesinas naturales, receptores de inmunoglobulina, receptores de familia TNFR, receptores de familia B7, moléculas de adhesión, integrinas, receptores de citosina/quimiocina, GPCRs,

receptores de factor de crecimiento, receptores de cinasa, antígenos específicos de tejido, antígenos de cáncer, receptores de reconocimiento de patógenos, receptores de complemento, receptores de hormona o moléculas solubles tales como citosinas, quimiocinas, leucotrienos, factores de crecimiento, hormonas o enzimas o canales de iones, epítopes, fragmentos y formas de los mismos modificadas de modo post-translacional.

En una forma de realización la molécula de anticuerpo multiespecífico de la divulgación puede usarse para alterar funcionalmente la actividad del (de los) antígeno(s) de interés. Por ejemplo, la proteína de fusión de anticuerpo puede neutralizar, antagonizar o agonizar la actividad de dicho antígeno, directa o indirectamente.

En una forma de realización, V_1 y V_2 son específicos para el mismo antígeno, por ejemplo enlazando el mismo epítope o uno diferente allí dentro. En una forma de realización V_1 es específico para albúmina de suero humano. En una forma de realización V_2 es específico para albúmina de suero humano. En una forma de realización V_1 y V_2 son específicos para dos antígenos diferentes.

En una forma de realización V_1 y V_2 son específicos para los mismos antígenos, por ejemplo los mismos o diferentes epítopes en el mismo antígeno.

En una forma de realización, un antígeno de interés enlazado por V_H/V_L o V_1 o V_2 proporciona la capacidad de reclutar funciones efectoras, tal como activación de ruta de complemento y/o reclutamiento de célula efectora.

El reclutamiento de la función efectora puede ser directo en aquella función efectora que está asociada con una célula y dicha célula lleva una molécula de reclutamiento en su superficie. El reclutamiento indirecto puede ocurrir cuando se enlaza un antígeno a un dominio de enlazamiento de antígeno (tal como V_1 o V_2) en la molécula de acuerdo con la presente divulgación, un polipéptido de reclutamiento causar la liberación de, por ejemplo, un factor que a su vez puede reclutar directa o indirectamente una función efectora, o puede estar por medio de activación de una ruta de señalización. Ejemplos incluyen IL2, IL6, IL8, IFNγ, histamina, C1q, opsonina y otros miembros de las cascadas de activación de complemento, clásicas y alternativas, tal como convertasa de C2, C4, C3, y C5 a C9.

Tal como se usa en la presente, "un polipéptido de reclutamiento" incluye una FcγR tal como FcγRI, FcγRII y FcγRIII, una proteína de ruta de complemento tal como, pero sin limitación, C1q y C3, una proteína marcadora de CD (conglomerado de marcador de diferenciación) o un fragment de los mismos que retiene la capacidad de reclutar función efectora mediada por célula, ya sea directa o indirectamente. Un polipéptido de reclutamiento también incluye moléculas de inmunoglobulina tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE y IgA que tienen función efectora.

En una forma de realización un dominio de enlazamiento de antígeno (tal como V_1 o V_2 o V_H/V_L) en la moléculas de anticuerpo multi-específico de acuerdo con la presente divulgación tiene especificidad por una proteína de ruta de complemento, y C1q se prefiere de manera particular.

Además, las moléculas de anticuerpo multi-específico de la presente divulgación pueden usarse para formar quelatos de radionúclidos por virtud de un único anticuerpo de dominio que se enlaza a una proteína quelante de núclido. Tales proteínas de fusión son de uso en las estrategias para captura de imágenes o selección de radionúclidos objetivos para terapia.

En una forma de realización, un dominio de enlazamiento de antígeno dentro de una molécula de acuerdo con la divulgación (tal como V_1 o V_2 o V_H/V_L) tiene especificidad por una proteína transportadora de suero, una molécula de inmunoglobulina circulante, o CD35/CR1, por ejemplo para proporcionar una semi-vida extendida al fragmento de anticuerpo con especificidad por dicho antígeno de interés enlazándose a dicha proteína transportadora de suero, molécula de inmunoglobulina circulante o CD35/CR1.

Tal como se usa en la presente, "proteínas transportadoras de suero"incluyen proteína de enlazamiento de tiroxina, transtiretina, glicoproteína α1-ácida, transferrina, fibrinógeno y albúmina, o un fragmento de cualquiera de los mismos.

Tal como se usa en la presente, una "molécula de inmunoglobulina circulante" incluye IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sIgA, IgM y IgD, o un fragmento de cualquiera de las mismas.

CD35/CR1 es una proteína presente en células de glóbulos rojos con una semi-vida de 36 días (intervalo normal de 28 a 47 días; Lanaro *et al.,* 1971, Cancer, 28(3):658-661).

En una forma de realización, el antígeno de interés por el cual V_H/V_L tiene especificidad es una proteína transportadora de suero, tal como un transportador de suero humano, tal como albúmina de suero humano.

En una forma de realización, el antígeno de interés por el cual V_1 tiene especificidad es una proteína transportadora de suero, tal como un transportador de suero humano, tal como albúmina de suero humano.

En una forma de realización, el antígeno de interés por el cual V_2 tiene especificidad es una proteína transportadora de suero, tal como un transportador de suero humano, tal como albúmina de suero humano.

En una forma de realización sólo uno de V_H/V_L, V_1 o V_2 tiene especificidad por una proteína transportadora de suero, tal como un transportador de suero humano, tal como albúmina de suero humano.

En una forma de realización un sitio de enlazamiento en el constructo de la presente divulgación comprende 6 CDRs, por ejemplo SEQ ID NO: 71 para CDRH1, SEQ ID NO: 72 para CDRH2, SEQ ID NO: 73 para CDRH3, SEQ ID NO: 74 para CDRL1, SEQ ID NO: 75 para CDRL2 y SEQ ID NO: 76 para CDRL3.

En una forma de realización las dichas SEQ ID NO: 71 a 76 de 6 CDRs se encuentran en la posición V_H/V_L en los constructos de la presente divulgación. En una forma de realización las dichas SEQ ID NO: 71 a 76 de 6 CDRs se encuentran en la posición V_1 en los constructos de la presente divulgación. En una forma de realización las dichas SEQ ID NO: 71 a 76 de 6 CDRs se encuentran en la posición V_2 en los constructos de la presente divulgación. En una forma de realización las dichas SEQ ID NO: 71 a 76 de 6 CDRs se encuentran en la posición V_1 y V_2 en los constructos de la presente divulgación. En una forma de realización las dichas SEQ ID NO: 71 a 76 de 6 CDRs se encuentran en la posición V_H/V_L y V_1 en los constructos de la presente divulgación. En una forma de realización las dichas SEQ ID NO: 71 a 76 de 6 CDRs se encuentran en la posición V_H/V_L y V_2 en los constructos de la presente divulgación.

En una forma de realización el sitio de enlazamiento de albúmina en un constructo de la presente divulgación comprende un dominio variable pesado seleccionado de SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 y un dominio variable de cadena ligera seleccionado de SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 80, en particular SEQ ID NO: 77 y 79 o SEQ ID NO: 78 y 80 para la cadena

pesada y ligera respectivamente. En una forma de realización estos dominios se encuentran en la posición V_H/V_L en los constructos de la presente divulgación. En una forma de realización estos dominios variables se encuentran en la posición V_1. En una forma de realización estos dominios variables se encuentran en la posición V_2. En una forma de realización estos dominios variables se encuentran en la posición V_1 y V_2. En una forma de realización estos dominios variables se encuentran en la posición V_H/V_L y V_1 en los constructos de la presente divulgación. En una forma de realización estos dominios variables se encuentran en la posición V_H/V_L y V_2 en los constructos de la presente divulgación. Cuando los dominios variables se encuentran en dos ubicaciones en los constructos de la presente divulgación el mismo par de dominios variables puede encontrarse en cada ubicación o pueden emplearse dos pares diferentes de dominios variables.

En una forma de realización las moléculas de anticuerpo multi-específico de la presente divulgación son procesadas para proporcionar afinidad mejorada para un antígeno o unos antígenos diana. Tales variantes pueden obtenerse mediante un número de protocolos de maduración de afinidad que incluyen mutar las CDRs (Yang *et al* J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), reorganización de cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), reorganización de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), exposición de fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri *et al* Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al* (*supra*) discute estos métodos de maduración de afinidad.

Afinidad mejorada, tal como se emplea en la presente en este contexto, se refiere a un mejoramiento sobre la molécula inicial.

Si se desea un constructo de anticuerpo multi-específico para uso en la presente divulgación, puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una sola molécula efectora o dos o más de tales moléculas conectadas de tal manera que forman un solo residuo que puede conectarse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo conectado a una molécula efectora, esta puede prepararse mediante procedimientos químicos o recombinante es de ADN estándar en los cuales el fragmento de anticuerpo está conectado directamente o por medio de un agente de acoplamiento con la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom *et al* Controlled Drug Delivery, 2ª Ed., Robinson *et al* eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe *et al* 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik *et al* 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 y WO03031581. De modo alternativo, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido, la conexión puede lograrse utilizando procedimientos recombinantes de ADN, por ejemplo tal como se describe en WO86/01533 y EP0392745.

El término “molécula efectora” tal como se usa en la presente incluye, por ejemplo, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otro anticuerpo u otros fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o que existen naturalmente, ácidos nucleicos y fragmento de los mismos, por ejemplo ADN, ARN y fragmento de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduros, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupo

reporteros tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante RMN o espectroscopia de ESR.

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados, como 111In y 90Y, Lu177, Bismuto213, Californio252, Iridio192 y Tungsteno188/Renio188; o medicamentos tales como pero no limitados a, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas en lecturas incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, pseudomonas exotoxina, o toxinas de difteria, una proteína tal como insulina, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento de nervio, factor de crecimiento derivado de plaqueta, o activador de plasminógeno de tejido, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina, o un modificador de respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor estimulante de colonia de macrófago de granulocito (GM-CSF), factor estimulante de colonia de granulocito (G-CSF), factor de crecimiento de nervio (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles en diagnóstico, por ejemplo. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminescentes, nucleídos radiactivos, metales de emisión de positrón (para uso en tomografía de emisión de positrón), y iones de metal paramagnético no radioactivo. Véase, en términos generales, US4,741,900 para iones de metal que pueden conjugarse con anticuerpos para usar en diagnóstico. Enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinaesterasa; grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y nucleídos radiactivos adecuados incluyen 125I, 131I, 111In y 99Tc.

En otra forma de realización la molécula efectora puede incrementar la semi-vida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o aumentar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmune. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de enlazamiento de albúmina o compuestos de enlazamiento de albúmina, tales como aquellos descritos en WO05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero, en general puede ser un polímero sintético o uno que existe naturalmente, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno, opcionalmente sustituidos, de cadena recta o ramificada, o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homo- o hétero- polisacárido.

Sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos ya mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico), opcionalmente sustituidos, de cadena recta o

ramificada, o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de los mismos.

Polímeros específicos que existen naturalmente incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.

"Derivados" tal como se usa en la presente tienen el propósito de incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos con tiol, tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar conectado directamente o a través de un segmento conector con el polímero. Se apreciará que el residuo de un grupo así en algunos casos formará parte del producto como el grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variar según se desea, pero generalmente se encontrará en un intervalo de peso molecular promedio desde 500Da a 50000Da, por ejemplo desde 5000 a 40000Da, como desde 20000 a 40000Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular con base en el uso destinado del producto, por ejemplo la capacidad de localizar ciertos tejidos tales como tumores o para extender la semi-vida circulante (para una reseña véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). De esta manera, por ejemplo, cuando el producto está destinado para abandonar la circulación y penetrar el tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular más alto, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000Da a 40000Da.

Polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 15000Da hasta aproximadamente 40000Da.

En una forma de realización, los anticuerpos para usarse en la presente divulgación están conectados a residuos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden estar conectadas a través de cualquier cadena lateral de aminoácidos disponible o grupo funcional de aminoácido terminal localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo libre amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Tales aminoácidos pueden existir naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden diseñarse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, US5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). En una forma de realización, la moléculas de anticuerpo de la presente invención es un fragmento de Fab modificado en el cual la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la adhesión de una molécula efectora. De manera adecuada, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los cuales la molécula efectora puede adherirse. Pueden usarse múltiples sitios para adherir dos o más moléculas de PEG.

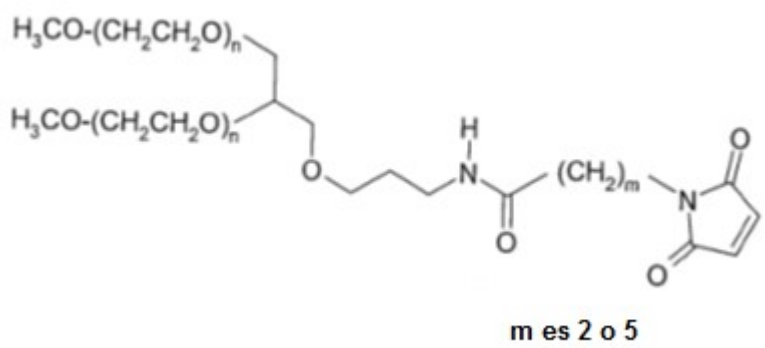
De manera adecuada, las moléculas de PEG están conectadas de modo covalente por medio de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero adherida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar conectada de modo covalente con el átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado

en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace de disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se utiliza un grupo tiol como el punto de adhesión, pueden utilizarse moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como derivados de maleimidas y cisteína. Puede utilizarse un polímero activado como el material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero, tal como se ha descrito antes en la presente. El polímero activado obedecer cualquier polímero que contiene un grupo reactivo tiol, tal como un ácido α-halocarboxílico o éster, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinilo- sulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nektar, antiguamente Shearwater Polimers Inc., Huntsville, AL, Estados Unidos) o puede prepararse a partir de materiales de partida comercialmente disponibles utilizando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que puede obtenerse de Nektar, antiguamente Shearwater; Rapp Polimere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, antiguamente Shearwater).

En una forma de realización, un $F(ab')_2$, Fab o Fab' en la molécula es PEGilado, es decir tiene PEG (poli(etilenglicol)) enlazada de modo covalente a la misma, por ejemplo de acuerdo con el método divulgado en EP 0948544 o EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical y Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethylenglycol) Chemistry y Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En una forma de realización, PEG está conectado con una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento de Fab modificado con PEG tiene un grupo de maleimida conectado de modo covalente con un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede enlazarse de modo covalente con el grupo de maleimida y con cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina puede estar enlazado un polímero metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular aproximado de 20,000Da. El peso molecular total del PEG enlazado al fragmento de Fab puede ser, por lo tanto, de aproximadamente 40,000Da.

Las moléculas particulares de PEG incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etil amida de N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) MW 20,000) lisina modificada, también conocida como PEG2MAL40K (obtenibles de Nektar, antiguamente Shearwater).

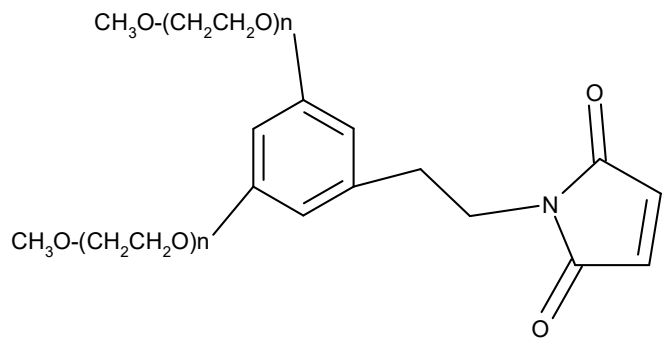
Fuentes alternativas de conectores de PEG incluyen NOF que suministran GL2-400MA2 (en cuyo caso m es 5 en la estructura a continuación) y GL2-400MA (donde m es 2) y n es aproximadamente 450:



.

Es decir que cada PEG es de aproximadamente 20,000Da.

Otras moléculas efectoras de PEG alternativas del siguiente tipo:



se encuentran disponibles en Dr Reddy, NOF y Jenkem.

En una forma de realización se proporciona una molécula de anticuerpo que está PEGilada (por ejemplo con un PEG descrito en la presente), enlazada por medio de un residuo de aminoácido cisteína en o aproximadamente el aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo el aminoácido 226 de la cadena pesada (mediante numeración secuencial).

En una forma de realización se proporciona una secuencia de polinucleótido que codifica una molécula de la presente divulgación, tal como una secuencia de ADN.

En una forma de realización se proporciona una secuencia de polinucleótido que codifica una o más, tal como dos o más, o tres o más componentes de polipéptido de una molécula de la presente divulgación, por ejemplo:

a) una cadena de polipéptido de fórmula (**I**):

$$\mathbf{V_H\text{-}CH_1\text{-}X\text{-}V_1;}\ \text{y}$$

b) una cadena de polipéptido de fórmula (**II**):

$$\mathbf{V_L\text{-}C_L\text{-}Y\text{-}V_2};$$

en las cuales:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

CH_1 representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o un conector;

Y representa un enlace o un conector;

V_1 representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V_2 representa dsFv, un sdAb, un scFV o un dsscFv;

en cuyo caso al menos uno de V_1 o V_2 es un dsFv o dsscFv.

En una forma de realización, el polinucleótido, tal como el ADN se encuentra comprendido en un vector.

La persona experta apreciará que cuando V_1 y/o V_2 representa un dsFv, el anticuerpo multi-específico comprenderá un tercer polipéptido que codifica el dominio de V_H o V_L correspondiente libre que no está enlazado con X o Y. Por consiguiente, la proteína multi-específica de la presente invención puede estar codificada por una o más, dos o más o tres o más polinucleótidos y estos pueden estar incorporados a uno o más lectores.

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

También se proporciona una célula hospedera que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican una proteína multi-específica de la presente invención. Cualquier sistema adecuado de célula hospedera/vector puede usarse para expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Pueden usarse sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas de expresión de célula hospedera que son microbianos o eucariotas, por ejemplo mamíferos. Las células hospederas mamífera as adecuadas incluyen células de CHO, mieloma, NSO mieloma y células de SP2, células de COS o células de hibridoma.

La presente divulgación también proporciona un proceso para la producción de una proteína multi-específica de acuerdo con la presente divulgación que comprende cultivar una célula hospedera que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para guiar la expresión de proteína a partir de ADN que codifica la proteína multi-específica de la presente invención, y aislar la proteína multi-específica.

Para producción de productos que comprenden tanto cadena pesada como cadena ligera, la línea celular puede transfectarse con dos vectores; un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. De modo alternativo puede usarse un solo vector y el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada. En un ejemplo la línea celular puede transfectarse con dos vectores y cada uno codifica una cadena de polipéptido de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Cuando V_1 y/o V_2 son un dsFv, la línea celular puede estar transfectadas con tres vectores y cada uno codifica una cadena de polipéptido de una proteína multi-específica de la invención.

En una forma de realización la línea celular es transfectada con dos vectores y cada uno codifica un polipéptido diferentes seleccionado de:

a) una cadena de polipéptido de fórmula (**I**):

$$\mathbf{V_H\text{-}CH_1\text{-}X\text{-}V_1;}$$

b) una cadena de polipéptido de fórmula (**II**):

$$\mathbf{V_L\text{-}C_L\text{-}Y\text{-}V_2};$$

en las cuales:

V_H representa un dominio variable de cadena pesada;

CH_1 representa un dominio de una región constante de cadena pesada, por ejemplo el dominio 1 de la misma;

X representa un enlace o un conector;

Y representa un enlace o un conector;

V_1 representa un dsFv, un sdAb, un scFv o un dsscFv;

V_L representa un dominio variable de cadena ligera;

C_L representa un dominio de una región constante de cadena ligera, tal como Ckappa;

V_2 representa dsFv, un sdAb, un scFV o un dsscFv;

en cuyo caso al menos uno de V_1 o V_2 es un dsFv o dsscFv.

En una forma de realización cuando V_1 es un dsFv y el dominio V_H de V_1 está conectado con X, la línea celular puede estar transfectada con un tercer vector que codifica el dominio V_L de V_1.

En una forma de realización cuando V_1 es un dsFv y el dominio V_L de V_1 está conectado con X, la línea celular puede estar transfectada con un tercer vector que codifica el dominio V_H de V_1.

En una forma de realización cuando V_2 es un dsFv y el dominio V_H de V_2 está conectado con Y, la línea celular puede estar transfectada con un tercer vector que codifica el dominio V_L de V_2.

En una forma de realización cuando V_2 es un dsFv y el dominio V_L de V_2 está conectado con Y, la línea celular puede estar transfectada con un tercer vector que codifica el dominio V_H de V_2.

En una forma de realización cuando tanto V_1 como V_2 son un dsFv y el dominio V_L de V_2 está conectado con Y y el dominio V_L de V_1 está conectado con X, la línea celular puede estar transfectada con un tercer vector que codifica el dominio común V_H de ambos V_1 y V_2.

En una forma de realización cuando tanto V_1 como V_2 son un dsFv y el dominio V_H de V_2 está conectado con Y y el dominio V_H de V_1 está conectado con X, la línea celular puede estar transfectada con un tercer vector que codifica el dominio común V_L de ambos V_1 y V_2.

Se apreciará que la proporción de cada vector transfectado en la célula hospedera puede variarse a fin de optimizar la expresión del producto de anticuerpo multi-específico. En una forma de realización donde se usan dos vectores, la proporción de vectores puede ser de 1:1. En una forma de realización donde se usan tres vectores, la proporción de vectores puede ser de 1:1:1. Se apreciará que la persona experta es incapaz de encontrar una proporción óptima mediante ensayo rutinario de niveles de expresión de proteína siguiente a la transfección. De manera alternativa o adicionalmente, los niveles de expresión de cada cadena de polipéptido del constructo multi-específico de cada vector puede controlarse usando los mismos o diferentes promotores.

Se apreciará que dos o más o, cuando estén presentes, tres de los componentes de polipéptido pueden codificarse por un polinucleótido a vector sencillo. También se apreciará que cuando dos o más, en particular tres o más, de los componentes de polipéptido se codifiquen por un polinucleótido en un vector sencillo, la expresión relativa de cada

componente de polipéptido puede variarse utilizando diferentes promotores para cada polinucleótido que codifica un componente de polipéptido de la presente divulgación.

En una forma de realización, el vector comprende una sola secuencia de polinucleótido que codifica dos o, cuando están presentes, tres cadenas de polipéptido de la molécula de anticuerpo multi-específico de la presente invención bajo el control de un promotor sencillo.

En una forma de realización, el vector comprende una sola secuencia de polinucleótido que codifica dos o, cuando están presentes, tres cadenas de polipéptido de la molécula de anticuerpo multi-específica de la presente divulgación en cuyo caso cada secuencia de polinucleótido que codifica cada cadena de polipéptido se encuentra bajo el control de un promotor diferente.

Las proteínas multi-específicas de acuerdo con la presente divulgación se expresan a buenos niveles de las células hospederas. De esta manera, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos parecen optimizarse y ser propicios para procesamiento comercial.

De modo ventajoso, las moléculas de anticuerpo multi-específico de la presente divulgación minimizan la cantidad de agregación vista después de la purificación y maximizan la cantidad de monómero en las formulaciones del constructo a concentraciones farmacéuticos; por ejemplo, el monómero puede estar presente como el 50%, 60%, 70% o 75% o más, tal como el 80 o 90% o más tal como el 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% o más de la proteína total. En un ejemplo, una muestra purificada de una molécula de anticuerpo multi-específico de la presente divulgación sigue siendo monomérica en más de 98% o 99% después de en 28 días de almacenamiento a 4^0C. En un ejemplo, una muestra purificada de una molécula de anticuerpo multi-específico de la presente divulgación a 5mg/ml en salmuera con pH regulador con fosfato (PBS) sigue siendo monomérica en más de 98% después de 28 días de almacenamiento 4^0C.

Las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación y las composiciones que comprenden las mismas son útiles en el tratamiento, por ejemplo en el tratamiento y/o profilaxis de una condición patológica.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende una molécula de anticuerpo de la presente divulgación en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo aceptables en farmacia. Por consiguiente se proporciona el uso de un anticuerpo de la presente divulgación para uso en tratamiento y para la fabricación de un medicamento, en particular para una indicación divulgada en la presente.

T la composición se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo aceptable en farmacia. Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender adicionalmente un adyuvante aceptable en farmacia.

La presente divulgación también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende adicionar y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente divulgación conjuntamente con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo aceptable en farmacia.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o diagnóstica o puede estar acompañada por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo anticuerpos anti-IL-1β, anti-célula T,

anti-IFNγ o anti-LPS, o ingredientes que no son anticuerpos, tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

En otra forma de realización, el anticuerpo, un fragmento o una composición de acuerdo con la divulgación se emplean en combinación con otro agente activo desde el punto de vista farmacéutico.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de manera adecuada una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula de anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva", tal como se usa en la presente se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que se necesita para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición diana, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, habitualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo apropiado de concentración y la ruta de administración. Tal información puede usarse luego para determinar dosis útiles y rutas para administración en humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva, precisa para un sujeto humano dependerá de la severidad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, combinación(es) medicamentosa(s), sensibilidades de reacción tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante experimentación rutinaria y se encuentra dentro del juicio del personal clínico. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva será de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo de 0.1 mg/kg a 20 mg/kg. De modo alternativo, la dosis puede ser de 1 a 500mg por día tal como de 10 a 100, 200, 300 o 400mg por día. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de manera conveniente en formas posológicas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención.

Las composiciones pueden administrarse individualmente un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, medicamentos u hormonas.

La dosis a la cual se administra la molécula de anticuerpo de la presente divulgación depende de la naturaleza de la condición que va a tratarse, la extensión de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se está usando de modo profiláctico o para tratar una condición existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la moléculas de anticuerpo tiene una vida media breve (por ejemplo de 2 a 10 horas), puede ser necesario dar una o más dosis al día. De manera alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media (por ejemplo de 2 a 15 días) puede ser necesario solamente dar una dosis una vez al día, una vez a la semana o una vez cada mes o 2 meses.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos al individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Vehículos adecuados pueden ser grandes macromoléculas lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli (ácido láctico), ácidos poli glicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivo.

Pueden usarse sales aceptables en farmacia, por ejemplo sales de ácidos minerales tales como clorohidratos, bromohidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Vehículos, que son aceptables en farmacia, en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, salmuera, glicerina y etanol. Adicionalmente, en tales composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares tales como agentes de mojado o emulsionantes Hugo sustancias de regulación de pH. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones para ingestión por parte del paciente.

Formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, preservantes, estabilizantes y/o dispersantes. De manera alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca para reconstitución antes de uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos que van a tratarse pueden ser animales. Sin embargo, en una o más formas de realización las composiciones se adaptan para administración a sujetos humanos.

En una forma de realización, en las formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o del fragmento porque si el pH de la formulación es 7, entonces un pI de 8-9 o un valor superior puede ser apropiado. Aunque no se desea estar vinculados por la teoría, se piensa que esto podría proporcionar básicamente una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo o el fragmento permanecen en solución.

Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación pueden administrarse mediante cualquier cantidad de rutas que incluyen, pero no se limitan a, la ruta oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intra-medular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hiposprais (inyectores a chorro) para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Normalmente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, ya sea como suspensiones o soluciones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución en, o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. Preferiblemente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención se administran de manera subcutánea, mediante inhalación o de modo tópico.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará mediante inyección, de modo subcutáneo, intraperitoneal, intravenoso o intramuscular, o se administrarán al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse a tejido específico de interés. El tratamiento de la dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

Se apreciará que el ingrediente active en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. De esta manera, si la composición va a administrarse mediante una ruta que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan el anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez se haya absorbido desde el tracto gastrointestinal.

En Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991) se encuentra disponible una discusión exhaustiva de los vehículos aceptables en farmacia (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una forma de realización, se proporciona la formulación como una formulación para administración tópica, incluyendo inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles de dosificación que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes (tales como soluciones o suspensiones nebulizables). De acuerdo con la divulgación, los polvos inhalables que contienen la sustancia activa pueden consistir solamente en las sustancias activas ya mencionadas o en una mezcla de las sustancias activas ya mencionadas con excipiente aceptable fisiológicamente.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo dextranos), polialcoholes (por ejemplo sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. De modo adecuado se usan mono- o disacáridos; el uso de lactosa o de glucosa, particularmente pero no exclusivamente en forma de sus hidratos.

Las partículas para deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo de 0.1 a 5 μm, en particular de 1 a 5 μm. El tamaño de las partículas del agente activo (tal como el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) es de importancia principal.

Los gases propelentes que pueden usarse para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propelentes adecuado se seleccionan entre hidrocarburos como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes mencionados pueden usarse solos o en mezclas de los mismos.

Gases propelentes particularmente adecuados son derivados halogenados de alcanos, seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados antes mencionados son particularmente adecuados TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propelente también pueden contener otros ingredientes tales como cosolventes, estabilizantes, agentes de superficie activa (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propelentes de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5 % en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, 0.002 a 5 % en peso, 0.01 a 3 % en peso, 0.015 a 2 % en peso, 0.1 a 2 % en peso, 0.5 a 2 % en peso o 0.5 a 1 % en peso de sustancia activa.

De modo alternativo, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante administración de una formulación solución o suspensión líquida, empleando por ejemplo dispositivo tal como un nebulizador; por ejemplo, un nebulizado conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizado Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R), fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

En una forma de realización se proporciona la formulación como ampollas discretas que contienen una dosis unitaria para administración por nebulización.

En una forma de realización el anticuerpo se suministra en forma liofilizada, para reconstitución o de modo alternativo como una formulación de suspensión.

El anticuerpo de la presente divulgación puede suministrarse dispersado en un solvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo solución salina fisiológica, un solvente aceptable en farmacología o una solución con regulador de pH. Las soluciones con pH regulado que se conocen en la técnica pueden contener 0.05 mg a 0.15 mg de edetato disódico, 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro, y 0.45 mg a 0.55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para lograr un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Tal como se ha mencionado *supra*, puede hacerse una suspensión de un anticuerpo liofilizado, por ejemplo.

Las formulaciones de suspensión o solución terapéutica también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen reguladores de pH (por ejemplo regulador de pH de citrato, regulador de pH de fosfato, regulador de pH de acetato y regulador de pH de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerina. Las soluciones o suspensiones pueden encapsularse en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estéril.

Esto puede incluir producción y esterilización por filtración de la solución de solvente con pH regulado que se utiliza para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de solvente estéril con pH regulado, y expender la formulación a receptáculos estériles mediante métodos familiares a aquellos de habilidad ordinaria en la técnica.

Puede proporcionarse formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, contenedores o viales plásticos sellados) empacada en sobres de lámina metálica. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen de 2 ml de solvente/solución reguladora de pH, por ejemplo.

Se piensa que los anticuerpos de la presente divulgación son adecuados para administración por medio de nebulización.

También es concebible que el anticuerpo de la presente invención puede administrarse mediante uso de terapia génica. A fin de lograr esto, se introducen a un paciente secuencias de ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes adecuados de ADN de modo que las cadenas de anticuerpo se expresan a partir de las secuencias de ADN y se ensamblan *in situ*.

La condición patológica o desorden pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), conmoción endotóxica asociada con infección, artritis tal como artritis reumatoide, asma tal como asma severa,

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad del intestino inflamado, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, embolia, diabetes tipo I, enfermedad de Lyme, meningoencefalitis, uveítis autoinmune, desórdenes inflamatorios mediados por el sistema inmune del sistema nervioso central y periférico, tal como esclerosis múltiple, lupus (tal como lupus sistémico eritematoso) y síndrome de Guillain-Barr syndrome, dermatitis atópica, hepatitis autoinmune, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nfropatía de IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, escleroderma, granulomatosis de Wegener, otros desórdenes autoinmunes, pancreatitis, traumas (cirugía), enfermedad de injerto versus hospedero, rechazo de trasplante, enfermedad cardiaca que incluye enfermedades sistémicas tal como infarto de miocardio así como también aterosclerosis, coagulación intravascular, reabsorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipoclorhidia.

La presente divulgación también proporciona una molécula de anticuerpo multi-específico de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de dolor, particularmente dolor asociado con inflamación.

De esta manera se proporciona un anticuerpo multi-específico de acuerdo con la presente divulgación para usar en tratamiento y métodos de tratamiento que emplean el mismo.

En una forma de realización se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo multi-específico (en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención).

En una forma de realización se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo multi-específico (en particular un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención) que comprende los pasos: realizar cromatografía de intercambio aniónico en modo sin enlazamiento de modo que las impurezas se retengan en la columna y el anticuerpo se mantenga en la fracción no enlazada. El paso puede realizarse, por ejemplo, a pH de aproximadamente 6-8.

El proceso puede comprender además un paso de captura inicial empleando cromatografía de intercambio catiónico realizada, por ejemplo, a pH de aproximadamente 4 a 5.

El proceso puede comprender además paso(s) adicionales de cromatografía para asegurar que las impurezas relacionadas con el producto y el proceso se separen de manera apropiada de la corriente de producto.

El proceso de purificación también puede comprender de uno o más pasos de ultra-filtración, tal como un paso de concentración y diafiltración.

La forma purificada, tal como se ha usado *supra* tiene el propósito de referirse a al menos 90% de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p o más pura.

Sustancialmente libre de endotoxina tiene el propósito de referirse a un contenido de endotoxina de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o menos tal como 0.5 o 0.1 EU por mg de producto.

Sustancialmente libre de proteína o de ADN de célula hospedera generalmente tiene el propósito de referirse a un contenido de ADN y/o proteína de célula hospedera de 400µg por

mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100µg por mg o menos, en particular 20µg por mg, según sea apropiado.

La molécula de anticuerpo de la presente invención también puede usarse en diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico *in vivo* in captura de imágenes de los estados patológicos.

En una forma de realización se proporciona un método de seleccionar un constructor de proteína multi-específica de acuerdo con la presente invención el cual comprende:

a) determinar el rendimiento de proteína multi-específica monomérica cuando cualquiera de V_1 o V_2 es un dsscFv para un par de región variable dado
b) determinar el rendimiento de proteína multi-específica monomérica cuando cualquiera de V_1 o V_2 ensayado en (a) es un dsFv para el mismo par de región variable y
c) comparar el rendimiento de monómero obtenido en (a) y (b) y seleccionar la proteína multi-específica con el rendimiento monomérico más alto.

Normalmente, el "par de región variable" en los pasos (a) y (b) del método es un par de V_H y V_L. Por lo general V_H y V_L forman juntos un dominio de enlazamiento de antígeno, V_1 o V_2. El método permite, por lo tanto, que el par V_H y V_L se ha ensayado tanto como un dsscFv como también un dsFv en los constructos de la presente invención y y el constructo más monomérico se selecciona en el paso (c).

Normalmente en los pasos (a) y (b) del método, el rendimiento se determina siguiendo una purificación, por ejemplo siguiendo cromatografía de afinidad. El rendimiento de monómero puede determinarse usando cualquier método adecuado tal como cromatografía de exclusión de tamaños.

"Que comprende", en el contexto de la presente especificación, tiene el propósito de significar "que incluye". Cuando sea técnicamente apropiado, pueden combinarse las formas de realización de la invención. Las formas de realización se describen en la presente de modo que comprendan algunos rasgos/elementos. La divulgación también se extiende a formas de realización separadas que consiste o consisten esencialmente en dichos rasgos/elementos.

Las referencias técnicas, tales como patentes y solicitudes de patentes se incorporan a la presente por referencia. Cualquier forma de realización enunciada en la presente de manera específica y explícita puede formar la base de un descargo (disclaimer), ya sea sola o en combinación con una u otras más formas de realización.

La presente divulgación se describe adicionalmente a manera de ilustración solamente en los siguientes ejemplos, los cuales se refieren a las figuras acompañantes en las cuales:

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra los constructos Fab-2xdsscFv y Fab-dsscFv-dsFv de la presente divulgación.

Figura 2 muestra análisis SDS-PAGE de proteínas Fab-1xdsscFv, 1xscFv y Fab-2xdsscFv purificados con Proteína G, expresados con HEK293

Figura 3 muestra análisis G3000 SE HPLC de proteínas Fab-1xdsscFv, 1xscFv y Fab-2xdsscFv purificadas con Proteína G, expresadas con HEK293,

Figura 4 análisis SDS-PAGE de proteínas Fab-2xdsscFv#3 purificadas, expresadas con HEK293

Figura 5 análisis S200 SE HPLC de proteínas Fab-2xdsscFv#3 purificadas, expresadas con HEK293

Figura 6 muestra análisis SDS-PAGE de diversos constructos Fab-dsscFv-dsFv purificados con Proteína G de la presente divulgación.
(A) Muestras Fab-dsscFv-dsscFv. **(B)** muestras Fab-dsscFv-dsFv

Figura 7 muestra análisis G3000 SE HPLC de constructos Fab-dssFv-dsFv purificados con Proteína G de la presente divulgación.

Figura 8 muestra análisis SDS-PAGE de diversos constructos de acuerdo con la presente divulgación en condiciones de reducción.

Figura 9 muestra análisis G3000 SE-HPLC de tiempo-curso de formatos monoméricos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv

Figura 10 muestra análisis SDS-Page de formatos Fab-2xscFv y Fab-2xdsscFv purificados con proteína-G, expresados con EXPiHEK

EJEMPLOS

Fragmentos de anticuerpo a ANTÍGENO 1 se etiquetan #1
Fragmentos de anticuerpo a ANTÍGENO 2 se etiquetan #2
Fragmentos de anticuerpo a ANTÍGENO 3 se etiquetan #3
Fragmentos de anticuerpo a ANTÍGENO 4 se etiquetan #4

EJEMPLO 1: Fab-2xdsscFv

<u>Construcción de plásmidos para expresión en células de mamíferos</u>

Fueron construidos plásmidos para la expresión de Fab#2-(HC)dsscFv#3,(LC)dsscFv#4 y Fab#2-(LC)dsscFv#3,(HC)dsscFv#4 (véase Figura 1), fusionando scFv#3 y scFv#4 del terminal C de la región constant kappa humana de alotipo Km3 de la cadena ligera #2 utilizando el conector flexible SGGGGSGGGGS [también denominado en la presente S, 2xG4S] (SEQ ID NO: 2), o fusionando scFv#3 y scFv#4 con el terminal C de la región constante CH_1 gamma-1 humana de isotipo γ1 de la cadena pesada #2 utilizando el conector flexible SGGGGTGGGGS [también denominado en la presente S, G4T, G4S] (SEQ ID NO: 1). Adicionalmente se introdujeron mutaciones puntuales en las secuencias de ADN en residuos seleccionados en la región marco de ambas vL#3/vL#4 y vH#3/vH#4. Las mutaciones (cadena pesada G44C y cadena ligera G100C) se introdujeron para crear enlace de disulfuro entre cadenas, entre la cadena pesada y la cadena ligera del Fv#3. Las mutaciones (cadena pesada G44C y cadena ligera Q100C) se introdujeron para crear un enlace de disulfuro entre cadenas entre entre la cadena pesada y la cadena ligera del Fv#4.

Los fragmentos de gen que codifican scFv#4 y dsscFv#4 (orientación de vHvL y vLvH) fueron fabricados químicamente y fusionados Fab#2 tal como se ha detallado antes para generar:

Plásmido e1: Ligera#2-(SGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 2])-vL#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO 68])-vH#4;

Plásmido f1: Ligera#2-(SGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 2])-dsvL#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-dsvH#4;

Plásmido e2: Ligera#2-(SGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 2])-vH#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-vL#4;

Plásmido f2: Ligera#2-(SGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 2])-dsvH#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])- dsvL#4;

Plásmido g1 Pesada#2-(SGGGGTGGGGS [SEQ ID NO: 1])-vL#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-vH#4;

Plásmido h1: Pesada#2-(SGGGGTGGGGS [SEQ ID NO: 1])-dsvL#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-dsvH#4;

Plásmido g2: Pesada#2-(SGGGGTGGGGS [SEQ ID NO: 1])-vH#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-vL#4; y

Plásmido h2: Pesada#2-(SGGGGTGGGGS [SEQ ID NO: 1])-dsvH#4-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-dsvL#4.

pND1 plásmido (Fab#2 Pesada-(SGGGGTGGGGS SEQ ID NO: 1)-dsvH#3-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS SEQ ID NO: 68)-dsvL#3) **[Plásmido i]** ya estaba disponible. El fragmento de gen que codifica dsHLscFv#3 fue extirpado de pND1 y fusionados a la cadena ligera#2 tal como se detalló antes para generar: Ligera#2-(SGGGGSGGGGS SEQ ID NO: 2)-dsvH#3-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS SEQ ID NO: 68)-dsvL#3 **[Plásmido j].**

Todos los formatos de fusión Fab fueron coronados a vectores de expresión mamíferos bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA.

<u>Expresión de formatos Fab-1xdssc Fv-1xscFv y Fab-2xdsscFv con HEK293</u>

Las células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos relevantes utilizando reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos fueron mezclados tal como se muestra en la tabla 4 para expresar los diferentes constructos:

Tabla 4

Constructo de anticuerpo	**Plásmidos usados**
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)HLscFv#4	1. **Plásmido e2** 2. **Plásmido i**
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsHLscFv#4	1. **Plásmido f2** 2. **Plásmido i**
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)LHscFv#4	1. **Plásmido e1** 2. **Plásmido i**
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsLHscFv#4	1. **Plásmido f1** 2. **Plásmido i**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)HLscFv#4	**1. Plásmido g2** **2. Plásmido j**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsHLscFv#4	**1. Plásmido h2** **2. Plásmido j**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)LHscFv#4	**1. Plásmido g1** **2. Plásmido j**

Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsLHscFv#4	**1. Plásmido h1** **2. Plásmido j**

La proporción de los plásmidos usados para las transfecciones fue de 1:1. Se incubó un total de 50µg de ADN plásmido con 125µl de 293fectin + 4.25ml de medio Optimem durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla se adicionó a 50ml de células HEK293 en suspensión a 1 x 10^6 células/ml y se incubó con agitación a 37°C. Se cosecharon sobrenadantes el día 10 mediante centrifugación a 1500g para retirar células y el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0.22µm. Se determinó el nivel de expresión por medio de HPLC de proteína-G.

La Tabla 5 muestra los resultados del ensayo de HPLC de la proteína-G. Como puede verse, los niveles de expresión de todos los constructos fueron comparables entre sí, cubriendo un intervalo de e 11-23µg/ml. Aquellos marcados con un asterisco (*) fueron expresados en una transfección separada, por lo tanto los niveles de expresión absoluta de LC-scFv#3, HC-scFv#4 no pudieron compararse con HC-scFv#3, LC-scFv#4.

Tabla 5

Constructo de anticuerpo	**Nivel de expresión (µg/ml)**
Fab#2(HC)dsHLscFv#3,(LC)HLscFv#4	23
Fab#2(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsHLscFv#4	18
Fab#2(HC)dsHLscFv#3,(LC)LHscFv#4	21
Fab#2(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsLHscFv#4	20
Fab#2(LC)dsHLscFv#3,(HC)HLscFv#4	13*
Fab#2(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsHLscFv#4	12*
Fab#2(LC)dsHLscFv#3,(HC)LHscFv#4	12*
Fab#2(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsLHscFv#4	11*

Purificación de formatos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv con proteína-G, expresados con HEK293

Los ~50ml de sobrenadantes de HEK293 fueron concentrados ~25 veces a ~2ml utilizando concentradores por centrifugación de corte de peso molecular de 10kDa. Los sobrenadantes concentrados se aplicaron a una columna de 1ml HiTrap proteína-G FF (GE Healthcare) equilibrada en fosfatos de 20mM, NaCl de 40mM pH7.4. La columna fue lavada con fosfato de 20mM, NaCl de 40mM pH7.4 y el material enlazado fue eluído con glicina/HCl de 0.1M pH2.7. El pico de elución fue recolectado y se ajustó el pH a ~pH7.0 con Tris/HCl de 2M pH8.5. Las eluciones con pH ajustado fueron concentradas y el regulador de pH fue intercambiado por PBS pH7.4 utilizando concentradores de centrifugación de corte de peso molecular de 10kDa.

Análisis SDS-PAGE de formatos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv purificados con proteína-G, expresados con HEK293

Se diluyeron muestras (2µg) con PBS a un volumen de 9.75µl al cual se adicionaron 3.75µl de 4xLDS de regulador de pH de muestra y 1.5µl de N-etilmaleimida de 100 mM (muestras no reducidas) o 1.5µl 10x de agente reductor NuPAGE (muestras reducidas). Las muestras fueron sometidas a vórtex, incubadas a 70ºC por 10 minutos, enfriadas y centrifugadas a 12500 rpm por 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron a gel de 4-20% de acrilamida Tris/Glicina SDS se corrieron por ~100 minutos a 125V, voltaje constante. Se utilizó escalera

de peso molecular SeeBluePlus2 (Life Technologies). Los geles fueron teñidos con tinte de proteína Instant Blue (Expedeon) y desteñidos con agua destilada.
Los tamaños de banda esperados después de reducir y no reducir SDS-PAGE se indican en la Tabla 6.

Tabla 6:

Tamaños de banda esperados después de SDS-PAGE (kDa) (H=cadena pesada, L=cadena ligera, +/- agentes de reducción)					
	- Red	+ Red		- Red	+ Red
Fab-1xdsscFv, 1x scFv	~100	H~50 L~50	**Fab-2xdsscFv**	~100	H~50 L~50

Para toda las proteínas, se esperaba que el gel no reductor mostrará una banda a ~100kDa, mientras que se esperaba que los geles reductores mostraran un doblete a ~50kDa con tinción igual en ambas bandas.
Para toda las proteínas Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv, los geles reductores SDS-PAGE mostraron patrones de bandas que indicaron que los constructos se estaban expresando correctamente en términos tanto de posición de migración como de intensidad de tinción con un doblete a ~50kDa (Figura 2B,D). La banda menor más importante adicional es consistente con una proteína no reducida de longitud completa. Tal como se esperaba, los multímero dos enlazados con disulfuro se ven sobre un gel no reductor (Figura 2A,C), el cual desaparece en condiciones de reducción (Figura 2B,D). La banda menor a ~50kDa en el gel no reductor (Figura 2A,C) puede ser consistente con la formación de enlace ds incompleta entre la cadena pesada y la cadena ligera en la región Fab.

Análisis G3000 SE-HPLC de formatos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv expresados con HEK293, purificados con Proteína-G

Se inyectaron 10µg de muestras de proteína purificada (100 µl de 0.1 mg/ml de solución madre diluida en PBS) a una columna TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm (Tosoh) 3 días post-purificación y se desarrollaron con un gradiente isocrático de fosfato de 200mM pH7.0 a 1ml/min. La detección de la señal fue por absorbancia a 280nm.
Los resultados se muestran en la Figura 3. Como puede verse de la Figura 3, después de la purificación de Proteína-G, los formatos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv eran monómero en 83-89%.
Aunque todas las muestras tienen niveles similares de monómero en el ensayo, aquellas muestras que contienen un scFv que carece del disulfuro de Fv están en un equilibrio dinámico. Esto significa que el % de monómero medido en el ensayo para estas muestras depende de la concentración de la muestra; muestras más concentradas dan % de monómero más alto y muestras menos concentradas dan % de monómero más bajo. En contraste, las muestras donde ambos scFv contienen un disulfuro son estables y no están en equilibrio dinámico. Por lo tanto, el % de monómero medido en el ensayo no cambia con los cambios en la concentración de la muestra.
Como los monómeros y multímeros en los formatos Fab-2xdsscFv son estables y no están en equilibrio dinámico, las muestras pueden purificarse fácilmente aún más para incrementar el % de monómero. Las muestras monoméricas purificadas también se mantendrán monoméricas

cuando la concentración del constructo en una formulación dada se incremente, haciendo de esta manera los constructos muy adecuados para usar en preparaciones farmacéuticas. En contraste, después de la purificación, Fab-2xscFv como monómero puede someterse al intercambio de dominio dinámico entre los dominios vL y vH de los dominios scFv. Por lo tanto, adicionalmente al riesgo incrementado de formación de dímero, trímero, estructuras y agregados de orden superior, tales moléculas son difíciles de observar puesto que formas no agregadas pueden separarse en monómero después de los pasos de disolución que se usan durante los métodos analíticos. Por lo tanto, Fab-2xdsscFv proporcionan claridad adicional durante el análisis de composiciones farmacéuticas.

Expresión con CHOS de formatos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv

Las células CHOS fueron transfectadas con los plásmidos relevantes mediante métodos de electroporación a escala de 1L. Fueron mezclados plásmidos tal como se muestra en la Tabla 7 para expresar la proteína. Se hicieron crecer cultivos en medio CD-CHO suplementado con GlutaMAX de 2 mM e incubados a 37ºC con 8% de CO_2 a 140 rpm por 24 h e incubados a continuación por otros 13 días a 32ºC. El día 4 post-transfección, se adicionó butirato de sodio a una concentración final de 3 mM al cultivo. El día 14 post-transfección, se cosecharon sobrenadantes de cultivo mediante centrifugación y se esterilizaron con filtro de 0.22 µm. Los títulos de expresión se midieron mediante HPLC de Proteína G (Tabla 8).

Tabla 7:

Constructo de anticuerpo	**Plásmidos usados**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)HLscFv#4	**3. Plásmido g2 1. Plásmido j**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsHLscFv#4	**3. Plásmido h2 1. Plásmido j**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)LHscFv#4	**3. Plásmido g1 1. Plásmido j**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsLHscFv#4	**3. Plásmido h1 1. Plásmido j**

Tabla 8:

Constructo de anticuerpo	**Nivel de expresión (µg/ml)**
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)HLscFv#4	15
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsHLscFv#4	17
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)LHscFv#4	18
Fab#2-(LC)dsHLscFv#3,(HC)dsLHscFv#4	16

Purificación con Proteína-G de formatos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv expresados con CHO

El 1L de sobrenadantes de CHO fueron concentrados ~25 veces a ~40 ml utilizando célula agitada un corte de peso molecular de 10kDa Amicon. Los sobrenadantes concentrados se cargaron a sistema de purificación AKTA Express con una columna de Proteína G y PBS

como regulador corriente de pH. El material enlazado fue eluído con glicina/HCl de 0.1 M pH2.7 y se ajustó el pH ~pH7.0 con Tris/HCl de 2M de pH8.5. El material eluído se concentró luego utilizando concentradores de peso molecular de 10kDa y el concentrado resultante se cargó a una columna Superdex (GE Healthcare) para filtración de gel con PBS como regulador de pH corriente. Se recolectaron picos de ilusión individual y se analizaron mediante HPLC de exclusión de tamaños para determinar la fracción monomérica. La proteína monomérica final fue concentrada a 5 mg/ml en PBS y almacenada a 4°C.

Análisis de SDS-PAGE de fracción monomérica de formatos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv purificados con Proteína-G, expresados con CHOS

Se diluyeron muestras (2 µg) con PBS a un volumen de 9.75µl al cual se adicionaron 3.75µl de regulador de pH de muestra 4xLDS y 1.5µl de N-etilmaleimida de 100 mM (muestras no reducidas) o 1.5µl de agente de reducción 10x NuPAGE (muestras reducidas). Las muestras fueron sometidas a vórtex, incubadas a 70ºC por 10 minutos, enfriadas y centrifugadas a 12500 rpm por 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron a un gel SDS de 4-20% de acrilamida Tris/glicina y se corrieron por ~100 minutos a 125V, voltaje constante. Se utilizó escalera de peso molecular Mark12 (Life Technologies). Los geles se tiñeron con tinte de proteína Instant Blue (Expedeon) y sedes tiñeron con agua destilada.

Los tamaños esperados de banda después de SDS-PAGE de reducción y no reducción se indican en la tabla 9.

Tabla 9:

Tamaños de banda esperados después de SDS-PAGE (kDa) (H=cadena pesada, L=cadena ligera, +/- agentes de reducción)					
	- Red	+ Red		- Red	+ Red
Fab-1xdsscFv, 1x scFv	~100	H~50 L~50	**Fab-2xdsscFv**	~100	H~50 L~50

Para toda las proteínas, se esperaba que el gel no reductor mostrara una banda a ~100kDa, mientras que se esperaba que los geles reductores mostraran un doblete a ~50kDa con tinción igual en ambas bandas.

Para toda las proteínas Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv, los geles SDS-PAGE de reducción mostraron patrones de bandas que indicaban que los constructos eran monoméricos y se expresaron correctamente en términos tanto de posición de migración como de intensidad de tinción con un doblete a ~50kDa (Figura 8B, D). La banda menor más importante adicional es consistente con la proteína no reducida de longitud completa (Figura 8B, D). Para toda las proteínas, el gel no reductor mostró una banda a ~100kDa, indicadora de la proteína de longitud completa (Figura 8A, a). Las bandas menores a ~50kDa en el gel no reductor (Figura 8A, b) pueden ser consistentes con la formación incompleta de enlace de disulfuro entre la cadena pesada y la cadena ligera en la región de Fab.

Análisis de tiempo-curso mediante G3000 SE-HPLC de formatos monoméricos Fab-1xdsscFv-1xscFv y Fab-2xdsscFv

5 mg/ml de monómero purificado del formato de anticuerpo fue almacenado a 4°C en PBS y analizado el día 4, el día 14 y el día 28 después de purificación. Las muestras se diluyeron en

PBS a 10 µg y se inyectaron a una columna de TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm, (Tosoh) y se desarrollaron con un gradiente isocrático de fosfato de 200mM pH7.0 a 1ml/min. La detección de señal fue por absorbancia a 280nm. Los resultados se muestran en la Figura 9. El día 4 post-purificación, el análisis de Fab-2xdsscFv indicó que la mayoría de la proteína era monomérica al inicio del experimento (líneas sólidas) y se mantuvo monomérica y estable en el curso del tiempo, con < 1 % definido como multímeros (dímeros, trímeros, agregados de órdenes superiores y grandes). Por otra parte, fue detectada una ocurrencia superior de multimerización para Fab-1xdsscFv-1xscFv que fue observada para incrementar linealmente en el tiempo (líneas punteadas). En realidad, la prevalencia de multimerización pareció más pronunciada con formatos que contenían scFvs estabilizados sin disulfuro en la orientación V_L/V_H. Sin embargo, es claro que los formatos que contienen un scFv que carece de disulfuro de Fv se encuentran en equilibrio dinámico y más propensos a la multimerización durante el almacenamiento que los scFvs que están estabilizados con disulfuro. En realidad, se ha mostrado que los formatos que contienen scFvs que están ambos estabilizados con disulfuro permanecen monoméricos incluso cuando se incrementa la concentración de la proteína en una formulación dada. Cuando ambos scFvs contienen un disulfuro de Fv, esto hace a los constructos idealmente adecuados para usar en preparaciones farmacéuticas donde el riesgo de formar órdenes superiores de multímeros o agregados grandes durante periodos de almacenamiento necesita críticamente ser insignificante.

EJEMPLO 2: Fab-2xdsscFv (bivalente con dos del mismo dsscFv)

<u>Construcción de plásmidos para expresión en las células de mamífero</u>

Se construyeron plásmidos para la expresión de Fab#2-(HC)dsscFv#3,(LC)dsscFv#3 (véase Figura 4), fusionando dsscFv#3 al terminal C de la región constante kappa humana de alotipo Km3 de la cadena ligera#2 utilizando el conector flexible SGGGGSGGGGS [también denominado en la presente S, 2xG4S] (SEQ ID NO: 2), o fusionando dsscFv#3 al terminal C de la región constante CH_1 gamma-1 humana de isotipo γ1 de la cadena pesada#2 utilizando el conector flexible SGGGGTGGGGS [también denominadas en la presente S, G4T, G4S] (SEQ ID NO: 1). Se introdujeron mutaciones puntuales a las secuencias de ADN en residuos seleccionados en la región marco tanto de vL#3/vL#1 como de vH#3/vH#1. Se introdujeron las mutaciones (cadena pesada G44C y cadena ligera G100C) para crear un enlace de disulfuro entre cadenas, entre la cadena pesada y la cadena ligera del Fv#3.

Plásmido pND1 (Fab#2 Pesada-(SGGGGTGGGGS [SEQ ID NO: 1)-dsvH#3-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-dsvL#3) **[Plásmido i]** ya estaba disponible. El fragmento de gen que codifica dsHLscFv#3 fue extirpado de pND1 y fusionado a cadena ligera#2 tal como se detalló antes para generar: Ligera#2-(SGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 2])- dsvH#3-(GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 68])-dsvL#3 **[Plásmido j].**

Los formatos de fusión de Fab fueron coronados a vectores de expresión de mamíferos bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA.

<u>Expresión con HEK293 de Fab-2xdsscFv#3</u>

Fueron transfectadas células HEK293 con los plásmido relevantes utilizando un reactivo de transfección 93fectin de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmido se mezclaron tal como se muestra en la tabla 10 para expresar la proteína:

Tabla 10

Constructo de anticuerpo	Plásmidos usados
Fab#2-(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsHLscFv#3	1. **Plásmido j** 2. **Plásmido i**

La proporción de los plásmidos usados para la transfección es fue de 1:1. Un total de 50µg de ADN de plásmido fue incubado con 125µl de 293fectin + 4.25ml de medio Optimem por 20mins a temperatura ambiente. La mezcla se adicionó luego a 50ml de células HEK293 en suspensión a 1 x 10^6 células/ml y se incubaron con agitación a 37°C. Se cosecharon sobrenadantes el día 10 mediante centrifugación a 1500 g para retirar células y el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0.22µm. El nivel de expresión fue determinado mediante HPLC de Proteína-G. La tabla 11 muestra los resultados del ensayo de HPLC de Proteína-G. El nivel de expresión fue de 20µg/ml.

Tabla 11

Constructo de anticuerpo	Nivel de expresión (µg/ml)
Fab#2(HC)dsHLscFv#3,(LC)dsHLscFv#3	20

Purificación de Fab-2xdsscFv#3 expresado en HEK293

Los ~50ml de sobrenadantes de HEK293 fueron concentrados ~25 veces hasta ~2ml utilizando concentradores de centrifugación de corte de peso molecular de 30kDa. Los sobrenadantes concentrados se purificaron y se concentraron adicionalmente y el regulador de pH se intercambió a PBS pH7.4 utilizando concentradores de centrifugación de cortes de peso molecular de 30kDa.

Análisis de SDS-PAGE de Fab-2xdsscFv#3 expresados con HEK293, purificados con Proteína-G

Se diluyeron muestras (2µg) con PBS a un volumen de 9.75µl al cual se adicionaron 3.75µl de regulador de pH de muestra 4xLDS y 1.5µl de N-etilmaleimida de 100 mM (muestras no reducidas) o 1.5µl de agente de reducción 10x NuPAGE (muestras reducidas). Las muestras fueron sometidas a vórtex, incubadas a 70ºC por 10 minutos, enfriadas y centrifugadas a 12500 rpm por 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron a un gel SDS de 4-20% de acrilamida Tris/glicina y se corrieron por ~100 minutos a 125V, voltaje constante. Se utilizó la escalera de peso molecular SeeBluePlus2 (Life Technologies). Los geles fueron teñidos con tinte de proteína Instant Blue (Expedeon) y desteñidos con agua destilada. Los tamaños de bandas esperados después de SDS-PAGE de reducción y de no reducción se indican en la tabla 12.

Tabla 12:

Tamaño de bandas esperados después de SDS-PAGE (kDa) (H=cadena pesada, L=cadena ligera, +/- agente de reducción)		
	- Red	+ Red
Fab-2xdsscFv#3	~100	H~50 L~50

Se esperaba que el gel no reductor mostrara una banda a ~100kDa, mientras que se esperaba que el hidrogel reductor mostrará un doblete a ~50kDa con tinción igual en ambas bandas.

Los geles SDS-PAGE de reducción mostraron patrones de bandas que indicaron que los constructos se estaban expresando correctamente en términos tanto de posición de migración como de intensidad de tinción con un doblete a ~50kDa (Figura 4B), sin embargo, algunas

especies menores adicionales también se observaron posiblemente debido al esquema de purificación sub-óptimo en oposición al método de purificación estándar mediado por Proteína-G que normalmente se usa para purificación de Fabs. Los multímeros conectados con disulfuro se ven en el gel no reductor (Figura 4A), que desaparecen en condiciones de reducción (Figura 4B).

Análisis de S200 SE-HPLC de Fab-2xdsscFv#3 purificado, expresado con HEK293

Se inyectaron 10µg de muestras de proteína purificada (100 µl de solución madre de 0.1 mg/ml diluida en PBS) a una columna Superdex 200 10/300 GL Tricorn (GE Healthcare) 3 días post-purificación y se desarrolló con un gradiente isocrático de PBS pH7.4 a 1ml/min, con detección continua por absorbancia a 280nm. Los resultados se muestran en la figura 5. Como puede verse de la figura 5, después de la purificación el formato Fab-2xdsscFv#3 era monómero en 81%.

EJEMPLO 3: Fab-(HC)dsscFv-(LC)dsFv

Construcción de plásmidos Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 y Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (conectados LC-vL) para expresión en células de mamíferos

Las proteínas de fusión de Fab#2 para la expresión de Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 y Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (conectados LC-vL) (véase Figura 6), fueron construidas fusionando dsscFv#1 (dsvH-4xG4S-dsvL) o dsvL#1 al terminal C de la región constante kappa humana de alotipo Km3 de la cadena ligera#2 utilizando el conector flexible SGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69) para generar:

Ligera#2-(SGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 69])-dsscFv#1 **[Plásmido b]** y

Ligera#2-(SGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 69])-dsvL#1 **[Plásmido c]**; y

fusionando HLdsscFv#3 (dsvH-4xG4S-dsvL) al terminal C de la región constante CH1 gamma-1 humana de isotipo γ1 de la cadena pesada#2 utilizando el conector flexible SGGGGSGGGGTGGGGS (SEQ ID NO: 70) para generar:

Pesada#2-(SGGGGSGGGGTGGGGS [SEQ ID NO: 70])-dsscFv#3 **[Plásmido a]**.

Se introdujeron mutaciones puntuales (cadena pesada G44C y cadena ligera G100C) a las secuencias de ADN en residuos seleccionados en la región marco de vL#3, vH#3, vL#1 y vH#1 para crear un enlace de disulfuro entre cadenas, entre la cadena pesada y la cadena ligera del Fv#3 y Fv#1. Los genes de cadena pesada y cadena ligera de fusión de Fab fueron coronados a vectores de expresión de mamíferos bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA.

Se fabricaron químicamente genes que codifican:

Pesada#2-(SGGGGSGGGGTGGGGS [SEQ ID NO: 70])-dsscFv#3 **[Plásmido a]** y

dsvH#1 dominio libre **[Plásmido d]**

y se clonaron individualmente a vectores de expresión de mamíferos bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA.

Se fabricaron químicamente los genes que codifican dsscFv#1 y dsvL#1 y se fusionaron al terminal C de cadena ligera#2 para crear:

Ligera#2-(SGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 69])-dsscFv#1 **[Plásmido b]** y

Ligera#2-(SGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 69])-dsvL#1 **[Plásmido c]**

y todos los constructos se clonaron a un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor HCMV-MIE y la secuencia SV40E poliA.

Expresión con HEK293 de:

Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 y
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (conectados LC-vL)
Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos relevantes usando reactivo de transfección 293fectin de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se mezclaron tal como sigue para expresar los diferentes constructos tal como se muestran en la tabla 13 a continuación:

Tabla 13

Constructo de anticuerpo	**Plásmidos usados**
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1	1. **Plásmido a** 2. **Plásmido b**
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (LC-vL linked)	1. **Plásmido a** 2. **Plásmido c** 3. **Plásmido d**

Para la combinación de 2 plásmidos, la proporción de los plásmidos usados para la transfección es fue de 1:1, mientras que para las combinaciones de tres plásmidos la proporción fue de 1:1:1. Se incubó un total de 50µg de ADN de plásmido con 125µl de 293fectin + 4.25ml de medio Optimem durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla luego se adicionó a 50 ml de células HEK293 en suspensión a 1 x 10^6 células/ml y se incubó con agitación a 37 °C. Se cosecharon sobrenadantes el día 10 por centrifugación a 1500 g para retirar las células y el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0.22µm. Se determinó el nivel de expresión por medio de HPLC de Proteína-G.
Los resultados se muestran en la tabla 14. Tal como puede verse, los niveles de expresión de ambos constructos fueron comparables entre sí (16-18µg/ml). Han habido reportes en la literatura de que la expresión de la regiones Fv que carecen de un conector entre vL y vH o un motivo de dimerización para juntar vL y vH tiene niveles de expresión sustancialmente más bajos que Fvs conectados. De manera sorprendente esto no se observa en los datos donde no se observó diferencia significativa entre el nivel de expresión de cada tipo de constructo.

Tabla 14:

Constructo	**Nivel de expresión (µg/ml)**
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1	18
Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (LC-vL linked)	16

Purificación con Proteína-G de Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 y Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 expresados con HEK293 (LC-vL conectados)
Los ~50ml de sobrenadantes de HEK293 fueron concentrados ~25 veces hasta ~2ml utilizando concentradores de centrifugación de recortes de peso molecular de 10kDa. Los sobrenadantes concentrados se aplicaron a una columna de 1ml HiTrap Proteína-G FF (GE Healthcare) equilibrada en fosfato de 20mM, NaCl de 40mM pH7.4. La columna fue lavada con fosfato de 20mM, NaCl de 40mM pH7.4 y el material enlazado fue eluído con glicina/HCl de 0.1M pH2.7. Fue recogido el pico de ilusión y el pH se ajustó a ~pH7.0 con Tris/HCl de 2M pH8.5. Las eluciones de pH ajustado se concentraron el regulador de pH fue intercambiado a PBS de pH7.4 usando concentradores de centrifugación de recorte de peso molecular de 10kDa.
Análisis de SDS-PAGE de Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC) dsscFv#1 y Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 purificados con Proteína-G, expresados con HEK293 (conectados LC-vL)

Se diluyeron muestras (2µg) con PBS a un volumen de 9.75µl a las cuales se adicionaron 3.75µl de regulador de pH de muestra de 4xLDS y 1.5µl de N-etilmaleimida de 100 mM (muestras no reducidas) o 1.5µl de agente reductor 10x NuPAGE (muestras reducidas). Las muestras fueron sometidas a vórtex, incubadas a 70^{0}C por 10 minutos, enfriadas y centrifugadas a 12500 rpm por 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron a un gel SDS de 4-20% de acrilamida Tris/Glicina y se corrieron por ~100 minutos a 125V, voltaje constante. Se utilizó escalera de peso molecular SeeBluePlus2 (Life Technologies). Los geles fueron teñidos con tinte de proteína Instant Blue (Expedeon) y desteñidos con agua destilada.

Los resultados se muestran en la figura 6. Para Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1, se esperaba que el gel no reductor mostrara una banda a ~100kDa, mientras que se esperaba que el hidrogel reductor mostrará un doblete a ~50kDa con tinción aproximadamente igual en ambas bandas. Para Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (conectados LC-vL), se esperaba que el gel no reductor mostrara una banda a ~100kDa, mientras que se esperaba que el gel reductor mostrara 3 bandas a ~50, ~36 y ~13kDa con tinción aproximadamente en la proporción 3:2:1 banda superior e inferior.

Los geles SDS-PAGE reductores mostraron patrones de bandas que indicaban que los constructos se estaban expresando correctamente en términos tanto de posición de migración e intensidad de tinción. Los geles SDS-PAGE no reductores mostraron patrones de bandas significativos >200kDa para Fab-2xdsscFv que eran consistentes con la multimerización (Figura 6A, carril 2) pero se observaron menos especies de alto peso molecular en la muestra de Fab-dsscFv-dsFv (Figura 6B, carril 2).

Análisis de G3000 SE-HPLC de Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 y Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 purificados con Proteína-G, expresados con HEK293, (LC-vL conectados)

Se inyectaron 10µg de muestras de proteína purificada (100 µl de solución madre de 0.1 mg/ml diluida en PBS) a una columna TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm, (Tosoh) 3 días post-purificación y se desarrolló con un gradiente isocrático de fosfato de 200mM pH7.0 a 1ml/min. La detección de señal fue por absorbancia a 280nm.

Los resultados se muestran en la figura 7. Después de la purificación con Proteína-G, el Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsFv#1 (LC-vL conectado) fue monómero en 91%, mientras que el Fab#2-(HC)dsscFv#3-(LC)dsscFv#1 fue monómero en 30%.

dsscFv#1 se conoce por ser particularmente propenso a la multimerización. Dado que los multímeros se unen físicamente por el conector dsscFv (el vL#1 o vH#1 está emparejado con vH#1 o vL#1 de una cadena de polipéptido diferente), reemplazando dsscFv#1 con dsFv#1 (que no comprende un conector scFv), hubo un incremento significativo en el porcentaje de monómero obtenido.

La persona experta apreciará de esta manera que dependiendo de la propensión del dsscFv a multimerizarse, en algunos casos sería ventajoso usar un dsFv en lugar de un dsscFv.

EJEMPLO 4 Afinidad de Biacore y demostración de enlazamiento simultáneo de antígenos diana

Las afinidades de enlazamiento y los parámetros cinéticos para las interacciones de Fab#2-(HC)dsHLscFv#3 (LC)dsHLscFv#4 se determinaron mediante resonancia plasmónica de superficie (SPR) realizada en BIAcore T100 o un BIAcore 3000 utilizando chips sensores CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) y regulador de pH corriente de HBS-EP (HEPES de 10mM (pH7.4), NaCl de 150mM, EDTA de 3mM, 0.05% v/v de surfactante P20). Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Las muestras de anticuerpo se capturaron en la superficie del chip sensor utilizando Fab de cabra $F(ab')_2$-específico humano (Jackson ImmunoResearch) o un anticuerpo monoclonal CH_1 antihumano generado en las propias instalaciones. Se logró inmovilización covalente del anticuerpo de captura mediante química de acoplamiento de amina estándar a nivel de 6000-7000 unidades de respuesta (UR).

Antígeno #2, #3 o #4 fue titulado por separado sobre el anticuerpo capturado. Cada ciclo de ensayo consistió en capturar primero la muestra de anticuerpo usando una inyección de 1 minuto antes que una fase de asociación que consistía en una inyección de 3 minutos de antígeno, después de lo cual se monitoreo la disociación por 10 minutos. Después de cada ciclo, la superficie de captura fue regenerada con inyecciones 2 × 1 min de HCl de 40 mM seguido de 30 s de NaOH de 5 mM. Los caudales usados fueron de 10 µl min^{-1} para captura, 30 µl min^{-1} para fases de asociación y disociación, y 10µl min^{-1} para regeneración. Se determinaron parámetros cinéticos mediante ajuste global simultáneo de los sensogramas resultantes a modelo de enlazamiento 1:1 estándar utilizando un software de evaluación BIAcore T100 v2.0.1 o BIAcore 3000 BIAEvaluation v3.2. Los resultados se muestran en la tabla 15, el anticuerpo mostró afinidades esperadas dentro del intervalo de pM – nM para los antígenos ensayados.

Tabla 15:

Analito	**ka(1/Ms)**	**kd(1/s)**	**KD(M)**	**KD(pM)**
Antígeno #2	5.06E+06	3.80E-05	7.51E-12	7.51
Antígeno #3	5.54E+06	6.43E-05	1.16E-11	11.6
Antígeno #4	7.75E+04	1.35E-04	1.74E-09	1740

El potencial de Fab#2-(HC)dsHLscFv#3 (LC)dsHLscFv#4 para enlazar simultáneamente a todos los 3 antígenos fue evaluado capturando el anticuerpo tri-específico al chip sensor por medio del anticuerpo antihumano inmovilizado IgG- $F(ab')_2$. Cada antígeno o una solución mezclada de antígenos #2, #3 y #4 fue titulada sobre el anticuerpo capturado en inyecciones de 3 min. Las respuestas de enlazamiento observadas para las inyecciones independientes y las respuestas combinadas se muestran en la tabla 16. La respuesta de enlazamiento para la solución combinada de antígenos #2/#3/#4 fue equivalente a la suma de las respuestas de las inyecciones independientes. Esto confirma que Fab#2-(HC)dsHLscFv#3 (LC)dsHLscFv#4 es capaz de enlazar simultáneamente todos los 3 antígenos ensayados.

Tabla 16:

Analito	**Enlazamiento (UR)**
Antígeno #2	58
Antígeno #3	38

Antígeno #4	47
Antígenos #2 + #3 + #4	**130 (143)**

Ejemplo 5 Comparación de rendimiento monomérico entre formatos Fab-2xscFv y Fab-2xdsscFv

Fueron transfectadas células EXpiHEK con los plásmidos relevantes mediante métodos de electroporación a escala de 50 ml. Fueron mezclados plásmidos tal como se muestra en la tabla 17 para expresar la proteína. Los cultivos se hicieron crecer en medio de expresión ExpiHEK y se incubaron a 37ºC con 8% CO_2 a 120 rpm por 16-18h, antes de la adición de promotor 1 y 2. Los cultivos se incubaron a continuación por otros 4 días at 37 °C. Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon por centrifugación y se esterilizaron con filtro de 0.22 µm. Se midieron títulos de expresión mediante HPLC de Proteína G (Tabla 18).

Tabla 17:

Constructo de anticuerpo	**Plásmidos usados**
Fab#4-(LC)HLscFv#5,(HC)HLscFv#6	**1. Plásmido k1** **2. Plásmido l1**
Fab#4-(LC)dsHLscFv#5,(HC)dsHLscFv#6	**1. Plásmido k2** **2. Plásmido l2**
Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)HLscFv#8	**1. Plásmido m1** **2. Plásmido n1**
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsHLscFv#8	**1. Plásmido m2** **2. Plásmido n2**
Fab#4-(LC) HLscFv#9,(HC)LHscFv#10	**1. Plásmido o1** **2. Plásmido p1**
Fab#4-(LC)dsHLscFv#9,(HC)dsLHscFv#10	**1. Plásmido o2** **2. Plásmido p2**
Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)LHscFv#10	**4. Plásmido q1** **5. Plásmido r1**
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsLHscFv#10	**1. Plásmido q2** **2. Plásmido r2**

Tabla 18:

Constructo de anticuerpo	**Expresión (µg/ml)**
Fab#4-(LC)HLscFv#5,(HC)HLscFv#6	62
Fab#4-(LC)dsHLscFv#5,(HC)dsHLscFv#6	31
Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)HLscFv#8	195
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsHLscFv#8	34
Fab#4-(LC) HLscFv#9,(HC)LHscFv#10	298
Fab#4-(LC)dsHLscFv#9,(HC)dsLHscFv#10	55
Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)LHscFv#10	226

Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsLHscFv#10	58

Purificación con Proteína-G de formatos de Fab-2xscFvFv y Fab-2xdsscFv expresados con EXPiHEK

Se concentraron sobrenadantes ~25 veces hasta ~2 ml utilizando concentradores de recorte de peso molecular de 10kDa. Los sobrenadantes concentrados fueron purificados mediante HPLC de Proteína-G usando regulador de pH de fosfato de pH7.4. El material enlazado fue eluído con glicina/HCl de 0.1 M pH2.7 y se ajustó el pH a ~pH7.0 con Tris/HCl de 2M pH8.5. El material eluído fue concentrado utilizando concentradores de peso molecular de 10kDa y el regulador de pH se intercambió a PBS. La proteína purificada fue concentrada a ~4-5 mg/ml en PBS y almacenada a 4°C.

Análisis de SDS-PAGE de formatos de Fab-2xscFv y Fab-2xdsscFv purificados con Proteína-G, expresados con EXPiHEK

Se diluyeron muestras (2 µg) con PBS a un volumen de 9.75µl al cual se adicionaron 3.75µl de regulador de pH de muestra 4xLDS y 1.5µl de N-etilmaleimida de 100 mM (muestras no reducidas) o 1.5µl de agente reductor 10x NuPAGE (muestras reducidas). Las muestras fueron sometidas a vórtex, incubadas a 70ºC por 10 minutos, enfriadas y centrifugadas a 12500 rpm por 30 segundos. Las muestras preparadas se cargaron a un gel SDS de 4-20% de acrilamida Tris/Glicina y se corrieron por ~100 minutos a 125V, voltaje constante. Se utilizó escalera de peso molecular Seeblue2 (Life Technologies). Los geles fueron teñidos con tinte de proteína Instant Blue (Expedeon) y desteñidos con agua destilada.

Los tamaños de banda esperados después de SDS-PAGE de reducción y no reducción se indican en la tabla 19.

Tabla 19:

Tamaños de banda esperados después de SDS-PAGE (kDa) (H=cadena pesada, L=cadena ligera, +/- agente reductor)					
	- Red	+ Red		- Red	+ Red
Fab-2xscFv	~100	H~50 L~50	**Fab-2xdsscFv**	~100	H~50 L~50

Para toda las proteínas, se esperaba que el gel no reductor mostrara una banda a ~100kDa, mientras que se esperaba que los geles reductores mostraran un doblete a ~50kDa con tinción igual en ambas bandas.

Para toda las proteínas Fab-2xscFv y Fab-2xdsscFv, los geles de SDS-PAGE de reducción mostraron patrones de bandas que indicaron que los constructos se expresaron correctamente en términos tanto de posición de migración como de intensidad de tinción con un doblete a ~50kDa (Figura 10B,a). La banda menor más importante adicional es consistente con la proteína de longitud completa no reducida (Figura 10B,b). Para toda las proteínas, el gel no reductor mostró una banda a ~130 kDa, indicativa de la proteína de longitud completa (Figura

10A,a). Las bandas a ~50kDa en el gel no reductor (Figura 10A, b) pueden ser consistente con la formación incompleta de enlace de disulfuro entre la cadena pesada y la cadena ligera en la región de Fab.

Análisis de G3000 SE-HPLC de formatos Fab-2xscFv y Fab-2xdsscFv

Las proteínas purificadas de anticuerpo a ~ 5 mg/ml fueron almacenadas a 4°C en PBS por 24 h antes de análisis. Se inyectaron muestras equivalentes a una concentración de 25 µg a una columna TSK Gel G3000SWXL, 7.8x300mm, (Tosoh) y se desarrollaron con un gradiente isocrático de fosfato de 200mM pH7.0 a 1ml/min. La detección de señal fue mediante absorbancia a 280nm. Los resultados se muestran en la tabla 20. El análisis indicó que toda las proteínas de Fab-2xdsscFv eran monoméricas en > 90 %. Por otra parte, se detectó una alta ocurrencia de multimerización para todos los Fab-2xscFv. Es claro que los formatos que contienen scFvs con un disulfuro de Fv son más monoméricos en comparación con scFvs que carecen de disulfuro de Fv. Esto indica una preferencia a usar formatos con scFvs que contienen disulfuro de Fv en términos de seleccionar moléculas terapéuticas con calidades estables y también atributos que serían ventajosos en un proceso de fabricación.

Tabla 20:

Formato	% de monómero
Fab#4-(LC)HLscFv#5,(HC)HLscFv#6	51.3
Fab#4-(LC)dsHLscFv#5,(HC)dsHLscFv#6	96.8
Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)HLscFv#8	80.8
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsHLscFv#8	98.8
Fab#4-(LC) HLscFv#9,(HC)LHscFv#10	84.9
Fab#4-(LC)dsHLscFv#9,(HC)dsLHscFv#10	94.3
Fab#4-(LC)HLscFv#7,(HC)LHscFv#10	53.2
Fab#4-(LC)dsHLscFv#7,(HC)dsLHscFv#10	90.8