

ANTICUERPOS QUE COMPRENDEN UN POLIPÉPTIDO INSERTADO EN LA REGIÓN 3 DEL MARCO

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a anticuerpos que comprenden un dominio variable (V) y un polipéptido de inserción dentro de la región 3 del marco del dominio V. Tales anticuerpos pueden proporcionar una funcionalidad y/o farmacocinética mejoradas para el polipéptido de inserción.

10

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

La alta especificidad y afinidad de los anticuerpos los hace agentes diagnósticos y terapéuticos ideales. Los avances en el campo de la tecnología de anticuerpos recombinantes han dado como resultado la producción de fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂. Estas moléculas más pequeñas retienen la actividad de unión a antígenos de los anticuerpos totales y también pueden exhibir propiedades farmacocinéticas y de penetración tisular mejoradas en comparación con las moléculas de inmunoglobulina totales. De hecho, los fragmentos de anticuerpos están demostrando ser agentes terapéuticos versátiles. Si bien tales fragmentos parecen exhibir un número de ventajas sobre las inmunoglobulinas totales, también sufren de una tasa aumentada de aclaramiento del suero, debido a que carecen del dominio Fc que les confiere una vida útil prolongada *in vivo* (Medasan, 1997, J. Immunol. 158:2211-2217). Los enfoques anteriores para mejorar la semivida sérica de las moléculas de anticuerpos incluyen la conjugación con agentes o dominios que interactúan con el receptor FcRn, tal como la albúmina sérica humana (HSA). PEG también ha demostrado mejorar la semivida sérica.

Se han descrito previamente anticuerpos con especificidad dual, es decir, que se unen a dos antígenos diferentes (para revisiones, véase Segal, 1999, Curr. Opin. Immunol. 11: 558-562; Pluckthun & Pack, 1997, Immunotechnology, 3: 83-105; Fischer y Leger, 2007, Pathobiology, 74: 3-14). Los enfoques anteriores para fabricar moléculas basadas en anticuerpos heterobiespecíficos generalmente emplean técnicas de ingeniería de proteínas o entrecruzamiento químico. El entrecruzamiento químico sufre de bajos rendimientos de formación de heterodímeros y homodímeros y del requisito de su posterior separación

cromatográfica. Los enfoques de ingeniería de proteínas han sido muy elaborados (ej, ingeniería de protuberancias en agujeros); Ridgway, 1996, Protein Eng. 9 (7): 617-621) o han utilizado moléculas con características de estabilidad inapropiadas (ej., diacuerpos, scFv). En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos también pueden sufrir problemas de impedimento estérico, de modo que ambos antígenos no pueden unirse simultáneamente a cada grupo de anticuerpo. Los anticuerpos de dominio variable único, también conocidos como anticuerpos de dominio único o sdAbs, corresponden a las regiones variables de bien sea la cadena pesada (VH) o ligera (VL) de un anticuerpo. Los anticuerpos murinos de dominio único se describieron por Ward, 1989, Nature, 341, 544-546. También se han descrito anticuerpos de dominio único humanos y humanos 'camelizados' (Holt, 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490). También se han obtenido anticuerpos de dominio único a partir de camélidos (camellos y llamas) y peces cartilaginosos (tiburones wobbegong y nodriza). Estos organismos han desarrollado dominios únicos tipo V de alta afinidad (llamados VHH en camélidos y V-NAR en tiburones), montados en un marco de dominio constante equivalente a Fc como un componente integral y crucial de su sistema inmunológico (véase Holliger & Hudson, para una revisión; 2005, Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136.

Como tal, sigue existiendo la necesidad de proporcionar más anticuerpos modificados tales como proteínas de fusión que comprendan una porción de anticuerpo que exhibe una o más propiedades deseadas, como una mayor funcionalidad (ej., unión multivalente) o una farmacocinética mejorada (ej., una semivida aumentada en suero). El objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo formato de anticuerpo modificado que exhiba una mayor funcionalidad (ej., mayor unión a su antígeno, unión biespecífica o unión multivalente) o farmacocinética mejorada (ej., una semivida aumentada en suero). En particular, la presente invención proporciona un nuevo formato de anticuerpo biespecífico, en particular estable y capaz de unirse simultáneamente a dos antígenos.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable (V) y un polipéptido de inserción, en donde el polipéptido de inserción está dentro de la región 3 del marco del dominio V.

En algunas modalidades, el dominio V es un dominio VH y el anticuerpo puede comprender además un dominio VL.

5 En algunas modalidades, el dominio V es un dominio VL y el anticuerpo puede comprender además un dominio VH.

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción está entre los residuos aminoácidos 73 y 76 del dominio VH. Por ejemplo, el polipéptido de inserción puede estar en el dominio VH: (i) entre los residuos aminoácidos 73 y 74; (ii) entre los residuos aminoácidos 74 y 75; o (iii) 10 entre los residuos aminoácidos 75 y 76.

En algunas modalidades, uno o más residuos aminoácidos entre 73 y 76 del dominio VH se reemplazan por el polipéptido de inserción.

15 En algunas modalidades, el polipéptido de inserción está entre los residuos aminoácidos 67 y 70 del dominio VL. Por ejemplo, el polipéptido de inserción puede estar en el dominio VL: (i) entre los residuos aminoácidos 67 y 68; (ii) entre los residuos aminoácidos 68 y 69; o (iii) entre los residuos aminoácidos 69 y 70.

20 En algunas modalidades, uno o más residuos de aminoácidos entre 67 y 70 del dominio VL se reemplazan por el polipéptido de inserción.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende además una secuencia enlazadora, preferiblemente de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve 25 o diez aminoácidos que se unen al extremo N- y/o C-terminal del polipéptido de inserción a la región 3 del marco.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo es una IgG de 30 longitud completa o un fragmento de unión de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, VHH o scFv, en particular dsscFv.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención está humanizado.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana (HSA). En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio VL que comprende CDR-L1 que tiene la secuencia SEC ID NO: 3; CDR-L2 que tiene la secuencia SEC ID NO: 4; CDR-L3 que tiene la secuencia SEC ID NO: 5. En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio VL que comprende la SEC ID NO: 2. En una modalidad, el anticuerpo comprende una cadena ligera (L) que comprende la SEC ID NO: 1. En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende CDR-H1 que tiene la secuencia SEC ID NO: 8; CDR-H2 que tiene la secuencia SEC ID NO: 9; CDR-H3 que tiene la secuencia SEC ID NO: 10. En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la SEC ID NO: 7. En una modalidad, el anticuerpo comprende una cadena pesada (H) que comprende la SEC ID NO: 6.

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción es una citocina, preferiblemente en donde la citocina se selecciona a partir de IL-10, IL-15, IL-2, G-CSF, GM-CSF y EPO. En otras modalidades, el polipéptido de inserción es esclerostina. En otras modalidades, el polipéptido de inserción es un segundo anticuerpo, preferiblemente en donde el segundo anticuerpo es un scFv, en particular un dsScFv, o un dominio de anticuerpo tal como VH o VL o VHH. El VHH puede comprender una secuencia seleccionada de las SEC ID NO: 67, 69 y 89. En tales modalidades, el anticuerpo puede unirse a su antígeno afín mediante dicho dominio V con una afinidad de unión que es de al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el anticuerpo sin el polipéptido de inserción presente.

En algunas modalidades, el segundo anticuerpo se une al mismo antígeno que el dominio V. Preferiblemente, el segundo anticuerpo se une a un epítipo diferente como el dominio V. En tales modalidades, el anticuerpo puede unirse a su antígeno afín con una afinidad de unión que es mayor que cuando se compara con el anticuerpo sin el segundo anticuerpo presente. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo se une a un antígeno diferente al primer anticuerpo, es decir, el anticuerpo que comprende un dominio V. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo se une a IL-17 y el primer anticuerpo, es decir, el anticuerpo que comprende un dominio V, se une a HSA. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo se une a CD3 y el primer anticuerpo, es decir, el anticuerpo que comprende un dominio V, se une a CD28. En algunas modalidades, el segundo anticuerpo se une a CD28 y el primer anticuerpo, es decir, el anticuerpo que comprende un dominio V se une a CD3.

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados, tales como moléculas de ADN, y vectores de clonación o expresión que codifican un anticuerpo descrito en el presente documento. También se proporciona una célula hospedera que comprende tales polinucleótido o vectores. La presente invención proporciona además un proceso para la producción de un anticuerpo como se describe en este documento, que comprende cultivar dicha célula hospedera y aislar el anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que comprende un dominio V y un polipéptido de inserción como se describe en la presente en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporciona dicho anticuerpo o dicha composición farmacéutica para su uso en terapia. También se proporciona un método de terapia que comprende administrar dicho anticuerpo o dicha composición farmacéutica a un sujeto que necesita la terapia. También se proporciona el uso de dicho anticuerpo para la fabricación de un medicamento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: (A) Estructura típica de Fab, resaltando la región de bucle marco 3; (B) resaltando ciertos residuos en la región 3 del marco de dominio variable de cadena pesada; (C) resaltando ciertos residuos en la región 3 del marco de dominio variable de cadena ligera.

Figura 2: (A) Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/IL-15_{Fwk3} a cadenas de receptores IL-15; (B) Estructura modelada que muestra el inserto IL-15 en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 3: (A) Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/IL-2_{Fwk3} a la cadena β del receptor IL-2 con y sin IL-15 agregado; (B) Estructura modelada que muestra el inserto IL-2 en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 4: (A) sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/G-CSF_{Fwk3} a HSA y/o receptor de G-CSF; (B) Estructura modelada que muestra el inserto G-CSF en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 5: (A) Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/GM-CSF_{Fwk3} (humano) al receptor GM-CSF, en comparación con un constructo CA645/GM-CSF_{CH1} (humano); (B) Estructura modelada que muestra el inserto GM-CSF en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 6: Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/GM-CSF_{Fwk3} (murino) al receptor GM-CSF, en comparación con un constructo CA645/GM-CSF_{CH1}(murino).

Figura 7: (A) Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/EPO_{Fwk3} al receptor de EPO con y sin EPO agregado; (B) Estructura modelada que muestra el inserto EPO en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 8: (A) Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/VHH6_{Fwk3} a IL-6, HSA, IL-6:gp80 con o sin HSA; (B) Estructura modelada que muestra el inserto VHH6 en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 9: (A) Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/VHH15_{Fwk3} a HSA y/o IL-6; (B) Estructura modelada que muestra el inserto VHH15 en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 10: (A) Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/Sclerostin_{Fwk3} (de núcleo o de longitud completa) al dominio extracelular de LRP6 con varios constructos enlazadores; (B) Estructura modelada que muestra el inserto del núcleo de esclerostina en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 11: Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA645/Sclerostin_{Fwk3} (de núcleo o de longitud completa) al dominio extracelular de LRP4 con varios constructos enlazadores.

Figura 12: (A) Sensorgrama SPR que muestra que CA645/(IL-10_{Fwk3})₂ tiene diferentes secuencias enlazadoras que se unen al receptor IL-10; (B) Estructura modelada que muestra el inserto dímero IL-10 en el marco 3 del dominio VH de CA645.

Figura 13: Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA497/IL-15_{Fwk3} a la cadena β del receptor IL-2 con y sin IL-15 agregado.

Figura 14: Sensorgrama de SPR que muestra la unión de CA240/IL-15_{Fwk3} a la cadena β del receptor IL-2 con y sin IL-15 agregado.

Figura 15: Sensorgrama SPR que muestra la serie de diluciones para la unión de HyHEL5/VHH D3L11_{Fwk3} a la lisozima.

Figura 16: Sensorgrama SPR que muestra la serie de diluciones para la unión de HyHEL5/VHH15_{Fwk3} a la lisozima.

Figura 17: Sensorgrama SPR que muestra la serie de diluciones para la unión de CA645/VHH D3L11_{Fwk3} a la lisozima.

Figura 18: Representación del esquema de unión potencial de HyHEL5/VHH D3L11_{Fwk3} a lisozima.

Figura 19: Sensorgrama de SPR que muestra que CA645/IL-15_{Fwk3} tiene diferentes secuencias enlazadoras que se unen a la cadena del receptor de IL-15.

Figura 20: Curvas DSC (línea continua: CA645 Fab; línea punteada: CA497 dsscFv; triángulo invertido: CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH); triángulo: CA645 Fab- Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL)).

Figura 21: Curvas de inhibición de IL-17A en ausencia (círculo sólido) o en presencia (círculo abierto) de HSA; (A) CA497 IgG4; (B) CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL); (C) CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH).

Figura 22: Análisis de SPR que muestra la unión de IL-17A y HSA a CA645 IgG4P inmovilizado que comprende un anti-IL-17 CA497 dsscFv (vHvL) insertado en la región Fwk3.

Figura 23: Curvas DSC. (A) IgG4P anti-CD28 que comprende un dsscFv anti-CD3 dentro de la región Fwk3 (línea continua); IgG4P anti-CD3 que comprende un dsscFv anti-CD3 dentro de la región Fwk3 (línea punteada). (B) Fab anti-CD28 que comprende un dsscFv anti-CD3 dentro de la región Fwk3 (línea continua); Fab anti-CD3 que comprende un dsscFv anti-CD3 dentro de la región Fwk3 (línea punteada).

Figura 24: Ensayo de activación de células T en PBMC. Triángulo abierto: anti-CD28 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv; círculo sólido: Fab anti-CD3; triángulo invertido sólido: anti-CD28 Fab; círculo sólido: anti-CD3 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv; cuadrado abierto: anti-CD28 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv; triángulo sólido: anti-CD3 IgG4P-Fwk3 anti-CD3 dsscFv; * símbolo: OKT3; círculo abierto: Solamente células de control. (A) Activación de células T CD4 (paciente 1) (B) Activación de células T CD4 (paciente 2) (C) Activación de células T CD8 (paciente 1) (D) Activación de células T CD8 (paciente 2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Anticuerpo

La presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable (V) y un polipéptido de inserción, en donde el polipéptido de inserción está dentro de la región marco 3 (Fwk3) del dominio V.

El anticuerpo de la presente invención se construye típicamente al incorporar el polipéptido de inserción en la región Fwk3 de un dominio V de un anticuerpo. El dominio V puede ser, por ejemplo, un dominio VH o un dominio VL. El anticuerpo en el que se incorpora el polipéptido de inserción puede considerarse un anticuerpo de andamiaje y/o cuando el

polipéptido de inserción también es un anticuerpo, el anticuerpo en el que se incorpora el polipéptido de inserción puede denominarse alternativamente el primer anticuerpo mientras que el polipéptido de inserción se denomina el segundo anticuerpo. Los términos "anticuerpo de andamiaje" y "primer anticuerpo" pueden usarse indistintamente en el contexto de la presente divulgación para referirse al anticuerpo en el que se incorpora el polipéptido de inserción.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo es una IgG de longitud completa o un fragmento de unión de la misma. En algunas modalidades, el anticuerpo es una IgG1 de longitud completa. En algunas modalidades, el anticuerpo es una IgG4 de longitud completa. En algunas modalidades, el anticuerpo es una IgG4P de longitud completa, en donde la serina en la posición 241 (numerada según el sistema de numeración de Kabat) se ha cambiado a prolina. En algunas modalidades, el anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, VHH o scFv. En algunas modalidades, el anticuerpo es un scFv estabilizado con disulfuro o "dsscFv". "Fragmento variable monocatenario estabilizado con disulfuro" o "dsscFv", como se emplea en la presente se refiere a un fragmento variable monocatenario que está estabilizado por un péptido enlazador entre el dominio variable V_H y V_L y también incluye un enlace disulfuro inter dominios entre V_H y V_L. (véase, por ejemplo, Weatherill, Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012; WO2007109254. En algunas modalidades, el enlace disulfuro inter-dominio entre V_H y V_L se forma entre las posiciones V_H44 y V_L100 (numeración según el sistema de numeración de Kabat).

El término "anticuerpo" como se usa en este documento generalmente se refiere a anticuerpos de longitud completa (intactos, totales), es decir, que comprenden elementos de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras en el caso de un anticuerpo IgG.

Los términos "constructo de anticuerpo", "anticuerpo modificado", "proteína de fusión de anticuerpo" se pueden usar indistintamente en el contexto de la presente invención para hacer referencia a un anticuerpo de la invención.

Los fragmentos de unión de anticuerpos generalmente comprenden al menos un dominio ligero variable (VL) o pesado variable (VH) e incluyen: anticuerpos de cadena sencilla (ej., una cadena pesada o cadena ligera de longitud completa), Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticuerpos de dominio único (sdAb, ej., VH o

VL o VHH), scFv, dsscFv, Bis-scFv, diacuerpos, tribcuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23 (9): 1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2 (3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de unión de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma, 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Por ejemplo, se pueden obtener fragmentos de unión de anticuerpos a partir de cualquier anticuerpo completo, especialmente un anticuerpo monoclonal completo, usando cualquier técnica de escisión y/o digestión enzimática adecuada, ej., tratamiento con pepsina. Alternativamente, el material de partida del anticuerpo puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y reexpresión del ADN que codifica las regiones variables y/o constantes del anticuerpo. Pueden usarse técnicas de biología molecular estándar para modificar, agregar o eliminar aminoácidos o dominios según se desee. Cualquier alteración de las regiones variables o constantes todavía está incluida en los términos regiones "variable" y "constante" como se usa en este documento. El material de partida del fragmento de anticuerpo puede obtenerse de cualquier especie, incluyendo, por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o humano. Se pueden obtener partes del fragmento de anticuerpo de más de una especie; por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El material de partida del fragmento de anticuerpo también puede modificarse. En otro ejemplo, la región variable del fragmento de anticuerpo se ha creado utilizando técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Tales versiones modificadas incluyen las creadas, por ejemplo, a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, eliminaciones o cambios en o a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Ejemplos particulares de este tipo incluyen aquellos dominios de región variable modificados que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos marco de un anticuerpo y el resto del dominio de región variable de un segundo anticuerpo. El formato Fab-Fv se describió por primera vez en el documento WO2009/040562, y la versión estabilizada con disulfuro del mismo, el Fab-dsFv, se describió por primera vez en el documento WO2010/035012. Otros fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, ej., biespecífico o puede ser monoespecífico (véase, por ejemplo, los documentos WO 92/22583 y WO05/113605). Un ejemplo de este

último es un Tri-Fab (o TFM) como se describe en el documento WO92/22583. Otro formato multi-específico se describe en WO2015/197772.

Una molécula típica de Fab' comprende un par de cadenas pesadas y ligeras en las que la
5 cadena pesada comprende una región variable VH, un dominio constante CH1 y una región bisagra natural o modificada y la cadena ligera comprende una región variable VL y un dominio constante CL.

Un dominio de unión de un anticuerpo comprende típicamente 6 CDR, tres de una cadena
10 pesada y tres de una cadena ligera. En tal anticuerpo, las CDR están en un marco y juntas forman una región variable. Por tanto, en una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio de unión específico para un antígeno que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. En otras modalidades, por ejemplo, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de dominio único, el dominio de unión puede comprender
15 solamente las 3 CDR de un dominio V único de una cadena pesada o una cadena ligera. Por tanto, en una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio de unión específico para un antígeno que comprende una región variable de cadena ligera (dominio VL) o una región variable de cadena pesada (dominio VH o VHH). Se apreciará que el dominio V que se une al antígeno puede hacerlo solo o en cooperación con otro dominio V, por ejemplo, como un par
20 VH/VL de complementario. Por consiguiente, el anticuerpo que comprende un dominio V puede unirse a su antígeno de manera cooperativa con un dominio V (VH o VL) complementario. En una modalidad, el dominio V es un dominio VH, y el anticuerpo de la invención comprende además un dominio VL, en donde el dominio VH se une a su antígeno de manera cooperativa con el dominio VL como un par VH/VL, es decir, el anticuerpo de la
25 invención comprende un dominio VH y une su antígeno cooperativamente con un dominio VL complementario. En una modalidad, el dominio V es un dominio VL, y el anticuerpo de la invención comprende además un dominio VH, en donde VL une su antígeno de forma cooperativa con el dominio VH como un par VH/VL, es decir, el anticuerpo de la invención.
30 comprende un dominio VL y une su antígeno cooperativamente con un dominio VH complementario.

El dominio de unión del anticuerpo de la invención se refiere típicamente al VH, VL o par de VH/VL que se une al antígeno.

Los anticuerpos contienen generalmente uno o más dominios de unión. Por ejemplo, un fragmento Fab no modificado comprende un dominio de unión formado por un par VH/VL, y

una IgG total comprende dos dominios de unión, cada uno formado por un par VH/VL, donde los dos dominios de unión son idénticos (anticuerpo monoespecífico) o diferente (anticuerpo biespecífico o bivalente). En un ejemplo, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento Fab que comprende un dominio VH y un polipéptido de inserción dentro de la región Fwk3 del dominio VH, y que comprende además un dominio VL que forma un par complementario con el dominio VH. En un ejemplo, el dominio VL puede no estar modificado (es decir, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que comprende un único polipéptido de inserción dentro de la región Fwk3 del dominio VH) o puede comprender un polipéptido de inserción en su región Fwk3 (es decir, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que comprende dos polipéptidos de inserción, idénticos, similares o diferentes, uno insertado dentro de la región Fwk3 del dominio VH y el otro insertado dentro de la región Fwk3 del dominio VL). En un ejemplo, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento Fab que comprende un dominio VL y un polipéptido de inserción dentro de la región Fwk3 del dominio VL, y que comprende además un dominio VH que forma un par complementario con el dominio VL. En un ejemplo, el dominio VH puede no estar modificado (es decir, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que comprende un único polipéptido de inserción dentro de la región Fwk3 del dominio VL) o puede comprender un polipéptido de inserción en su región Fwk3 (es decir, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que comprende dos polipéptidos de inserción, idénticos, similares o diferentes, uno insertado dentro de la región Fwk3 del dominio VL y el otro insertado dentro de la región Fwk3 del dominio VH). En otro ejemplo, el anticuerpo de la invención es una IgG completa que comprende un dominio VH y un polipéptido de inserción dentro de la región Fwk3 del dominio VH, y que además comprende un dominio VL que forma un par complementario con el dominio VH. En un ejemplo, el dominio VL puede no estar modificado (es decir, el anticuerpo de la invención es una IgG que comprende dos polipéptidos de inserción, cada uno insertado en uno de los dos dominios VH de la IgG) o puede comprender un polipéptido de inserción en su región Fwk3 (es decir, el anticuerpo de la invención es una IgG que comprende cuatro polipéptidos de inserción, idénticos, similares o diferentes, insertándose cada uno de ellos en la región Fwk3 de cada uno de sus dos dominios VH y dos dominios VL). En otro ejemplo, el anticuerpo de la invención es una IgG completa que comprende un dominio VL y un polipéptido de inserción dentro de la región Fwk3 del dominio VL, y que además comprende un dominio VH que forma un par complementario con el VL. El dominio VH puede no estar modificado (es decir, el anticuerpo de la invención es una IgG que comprende dos polipéptidos de inserción, cada uno insertado

en uno de los dos dominios VL de la IgG) o puede comprender un polipéptido de inserción en su región Fwk3 (es decir, el anticuerpo de la invención es una IgG que comprende cuatro polipéptidos de inserción, idénticos, similares o diferentes, insertándose cada uno de ellos en la región Fwk3 de cada uno de sus dos dominios VL y dos dominios VH).

5

Los residuos en los dominios variables del anticuerpo se enumeran convencionalmente de acuerdo con un sistema ideado por Kabat. Este sistema se expone en Kabat, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., NIH, EE. UU. Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, salvo que se indique lo contrario.

10

Las designaciones de residuos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos que en la numeración estricta de Kabat correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, ya sea una región estructural o determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. La correcta numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado mediante el alineamiento de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar" mediante métodos conocidos en la técnica.

15

20

Las CDR del dominio variable de la cadena pesada están ubicadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración de Kabat. Las CDR del dominio variable de la cadena ligera están ubicadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat. Además de los bucles CDR, existe un cuarto bucle entre CDR-2 y CDR-3 que está formado por el marco 3 (Fwk3). La Figura 1A proporciona una representación del bucle de marco 3 en el contexto de un Fab que tiene una cadena ligera y una pesada. La Figura 1B y 1C también muestra residuos representativos de estos bucles. El sistema de numeración de Kabat define el marco 3 como las posiciones 66-94 en una cadena pesada y las posiciones 57-88 en una cadena ligera.

25

30

Por tanto, en una modalidad, un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable (V) y un polipéptido de inserción, en donde el polipéptido de inserción está dentro de

las posiciones 66-94 cuando el dominio V es un dominio VH, o las posiciones 57-88 cuando el dominio V es un dominio VL, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción está entre los residuos de aminoácidos 73 y 76 del dominio VH, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Preferiblemente, el polipéptido de inserción puede estar entre los residuos de aminoácidos 73 y 74, 74 y 75, o 75 y 76 del dominio VH, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción está entre los residuos de aminoácidos 76 y 77, o 77 y 78 del dominio VH, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En algunas modalidades, uno o más residuos de aminoácidos del dominio VH se reemplazan por el polipéptido de inserción.

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción está entre los residuos de aminoácidos 67 y 70 del dominio VL, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Preferiblemente, el polipéptido de inserción puede estar entre los residuos de aminoácidos 67 y 68, 68 y 69, o 69 y 70 del dominio VL, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. En algunas modalidades, uno o más residuos de aminoácidos del dominio VL se reemplazan por el polipéptido de inserción.

El anticuerpo de la presente invención puede comprender además dominios de región constante. Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que pueden ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, pueden usarse dominios de región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando no se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Se apreciará que también se pueden usar variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado por prolina como se describe en Angal. Puede usarse Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. Un experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos pueden someterse a una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones a menudo depende de la línea de células huésped utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las

condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de las carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ. Journal of Chromatography 705: 129-134, 1995).

Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden ser anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo murino. El término "anticuerpo murino" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas derivadas exclusivamente de células B murinas. Este anticuerpo está por lo tanto constituido por secuencias de aminoácidos murinos, cualquiera que sea el origen de la célula que permite su producción.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo quimérico. El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en donde cada cadena ligera y/o cada secuencia de cadena pesada de la que está constituida comprende o consiste en una secuencia híbrida derivada de al menos dos animales diferentes, en particular mamíferos, en particular, un anticuerpo que combina la región variable de conejo, murino, rata o *cynomolgus* con la región constante humana.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, US 5.585.089). En particular, el término "humanizado" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR de un anticuerpo no humano (como un anticuerpo monoclonal de conejo, murino, rata, *cynomolgus* o llama) injertado en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor tal como un anticuerpo humano. En lugar de transferir la CDR completa, se pueden transferir solamente uno o más de los residuos determinantes de especificidad de cualquiera de las CDR descritas anteriormente en el presente documento al marco del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri, 2005, Methods, 36, 25-34). Los residuos de marco seleccionados del anticuerpo humanizado pueden sustituirse con los

residuos correspondientes (los denominados residuos de donantes) de un anticuerpo no humano (ej., el anticuerpo del que se derivan las CDR o los residuos determinantes de especificidad), ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

5 Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que la(s) región(es) variable(s) y la(s) región(es) constante(s) (si están presentes) de las cadenas pesada y/o ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, mediante métodos de presentación en
10 fagos y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la región variable y/o constante de inmunoglobulina murina han sido reemplazados por sus homólogos humanos, ej., como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 Bl, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP 0438474 Bl y EP0463151 Bl.

15

Los anticuerpos que comprenden un dominio V y un polipéptido de inserción como se describe en el presente documento pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, conjugarse químicamente con compuestos adicionales que pueden afectar ej., sus propiedades farmacocinéticas o unión a antígenos.

20

En un ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a fracciones de poli(etilenglicol) (PEG). Los anticuerpos enlazados al PEG pueden mostrar un aumento adicional de la semivida en suero, por ejemplo. En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir a través de cualquier grupo
25 funcional de aminoácido terminal o de cadena lateral de aminoácido disponible ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden aparecer de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, US 5.219.996; US 5.667.425; WO98 / 25971, WO2008 / 038024). En
30 un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. De manera adecuada, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o más

residuos de cisteína a los que puede unirse la molécula efectora. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

De forma adecuada, las moléculas de PEG pueden enlazarse covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. El enlace covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, se pueden usar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Puede usarse un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, ej., yodoacetamida, una imida, ej., maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión (medida por su constante de disociación K_D) por su antígeno afín de 10^{-5} M o menos, 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, o 10^{-11} M o menos. La afinidad se puede medir mediante técnicas conocidas tales como técnicas de resonancia de plasmones superficiales que incluyen BiacoreTM. La afinidad se puede medir a temperatura ambiente, 25 °C o 37 °C. La afinidad se puede medir a pH fisiológico, es decir, a pH 7.4 aproximadamente.

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por tanto, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por la albúmina. Tales variantes se

pueden obtener mediante varios protocolos de maduración por afinidad que incluyen la mutación de las CDR (Yang, J. Mol. Biol, 254. 392-403, 1995), mezcla de cadenas (Marks, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low, J. Mol. Biol., 260. 359-368, 1996), mezcla de ADN (Patten, Curr. Opin. Biotechnol, 8, 724-733, 1997),
5 presentación de fagos (Thompson, J. Mol. Biol, 256. 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer. Nature, 391, 288-291, 1998).

Anticuerpo de unión a la albúmina sérica humana

10 En una modalidad, el anticuerpo de la invención comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana (HSA). En tal modalidad, el anticuerpo puede ser útil para extender la semivida en suero del polipéptido de inserción. Se apreciará que el dominio V que se une a la albúmina puede hacerlo solo o en cooperación con otro dominio V, por ejemplo, como un par VH/VL de complementario. Por consiguiente, en algunas modalidades, el anticuerpo que
15 comprende un dominio V se une a la albúmina de forma cooperativa con un dominio VH o VL complementario. En una modalidad, el dominio V es un dominio VH, y el anticuerpo de la invención comprende además un dominio VL, en donde VH se une a la albúmina cooperativamente con el dominio VL como un par VH/VL, es decir, el anticuerpo de la invención comprende un dominio VH y se une a la albúmina de manera cooperativa con un
20 VL complementario. En una modalidad, el dominio V es un dominio VL, y el anticuerpo de la invención comprende además un dominio VH, en donde VL se une a la albúmina cooperativamente con el dominio VH como un par VH/VL, es decir, el anticuerpo de la invención comprende un dominio VL y se une a la albúmina de forma cooperativa con un VH complementario. Cuando el anticuerpo de la invención se une a la albúmina, el VH/VL se
25 denomina típicamente "dominio de unión a la albúmina". Como tal, el dominio de unión a la albúmina del anticuerpo de la invención se refiere a VH, VL o par de VH/VL que se une a la albúmina.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención se une a la albúmina sérica de
30 *cynomolgus*, albúmina sérica de murino y/o albúmina sérica de rata.

En una modalidad, se humaniza el anticuerpo de la presente invención que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana. En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención que comprende un dominio de unión a albúmina es un anticuerpo

- humanizado en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR de un anticuerpo monoclonal de conejo, murino o rata injertado en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano. En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención que comprende un dominio de unión a albúmina es un anticuerpo humanizado en
- 5 donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR de un anticuerpo de conejo injertado en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, y en donde el marco de región variable de cadena pesada y/o ligera comprende al menos una sustitución de aminoácido, tal como un aminoácido que es un residuo donante.
- 10 En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención, que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana, comprende una secuencia de cadena ligera y/o pesada como se muestra a continuación. (Dominio variable subrayado; CDR en ***negrita y cursiva***). En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención, que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana, comprende una secuencia de cadena ligera y/o pesada
- 15 seleccionada a continuación. En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención, que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana, comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera y/o pesada seleccionada a continuación. En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención, que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana, comprende al menos una secuencia de CDR-L1, CDR-L2 y
- 20 CDR-L3 y/o al menos una secuencia de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionada a continuación. En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención, que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana, comprende una secuencia de cadena ligera y/o pesada; y/o una secuencia de dominio variable de cadena ligera y/o pesada; y/o al menos una secuencia de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3; y/o al menos una secuencia de CDR-
- 25 H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionadas a continuación.

Cadena ligera CA645 (gL5)

30 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQOKPGKAPKLLIYEASKLTSG
VPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCGGGYSSISDTTFFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 1)

Dominio VL (gL5):

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC**QSSPSVWSNFL**SWYQQKPGKAPKLLI**YEASKLTS**
GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**GGGYSSISDTT**FGGGTKVEIK (SEC ID
NO: 2)

5

CDR-L1: QSSPSVWSNFLS (SEC ID NO: 3)

CDR-L2: EASKLTS (SEC ID NO: 4)

CDR-L3: GGGYSSISDTT (SEC ID NO: 5)

10 Cadena pesada CA645 (gH5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA**VS**GIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGII**WASGTT**
FYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
15 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC
ID NO: 6)

Dominio VH (gH5):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA**VS**GIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGII**WASGT**
20 **TFYATWAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDL**
WGQGT**LV**TVSS (SEC ID NO: 7)

CDR-H1: GIDLSNYAIN (SEC ID NO: 8)

CDR-H2: IIWASGTTFYATWAKG (SEC ID NO: 9)

25 CDR-H3: TVPGYSTAPYFDL (SEC ID NO: 10)

En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente invención comprende variantes de los dominios VL y VH que se unen a la albúmina sérica humana como se describió anteriormente (SEC ID NO: 2 y 7 respectivamente) que comprenden un residuo de cisteína
30 adicional de modo que se pueda formar un enlace disulfuro entre los dominios VL y VH. Las variantes adicionales que contienen cisteína pueden tener las siguientes secuencias (en donde los residuos de cisteína adicionales están subrayados):

Dominio VL de CA645-Cys (gL5):

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIK (SEC ID
NO: 102)

5 Dominio VH de CA645-Cys (gH5):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTF
YATWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQ
GTLVTVSS (SEC ID NO: 103)

10 Ejemplos adicionales de dominios VL y VH que se unen a la albúmina sérica humana y que
pueden usarse en el anticuerpo de la invención comprenden la SEC ID NO: 105, 106, 107,
108 y 109 como se describe a continuación (CDR en negrita y cursiva).

Dominio VH de CA645 (gH1):

15 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVS**GIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT**
FYATWAKGRFTISRDSTTVY LQMNSLRAEDTAVYYCART**VPGYSTAPYFDLWGQGT**
LTVSS (SEC ID NO: 105)

Dominio VH de CA645 (gH37):

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVS**GIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTTA**
YATWAKGRFTISRDN SKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCART**VPGYSTAPYFDLWGQ**
GTLVTVSS (SEC ID NO: 106)

Dominio VH de CA645 (gH47):

25 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVS**GIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT**
FYATWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDAVYYCART**VPGYSAAPYFDLWGQ**
GTLVTVSS (SEC ID NO: 107)

Dominio de CA645 VL (gL1):

30 DIVMTQSPSSVSASVGDRVITITC**QSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTS**
GVPSRFKSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**GGGYSSISDTT**FGGGTKVEIK (SEC ID

NO: 108)

Dominio de CA645 VL (gL4):

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC**QSSPSVWSNFL**SWYQQKPGKAPKLLIYE**ASKLTS**

5 GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC **GGGYSSISD TTF**GGG**TKVEIK**

(SEC ID NO: 109)

En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente invención comprende variantes de los dominios VL y VH que se unen a la albúmina sérica humana como se describió
10 anteriormente (SEC ID NO: 105 a SEC ID NO: 109) que comprenden un residuo de cisteína adicional de modo que se puede formar un enlace disulfuro entre los dominios VL y VH. Las variantes adicionales que contienen cisteína pueden tener la siguiente secuencia (en donde el resto de cisteína adicional está subrayado):

15 CA645-Cys VL (gL4):

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC**QSSPSVWSNFL**SWYQQKPGKAPKLLIYE**ASKLTSG**

VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**GGGYSSISD**TTFGCGTKVEIKRT(SEC ID NO: 110)

En algunas modalidades, el marco VH del dominio de unión a la albúmina es humano (por
20 ejemplo, VH3, como VH3 1-3 3-23) y comprende, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, tales como aminoácidos que son residuos donantes. En tales modalidades, el VH puede tener una secuencia mostrada en la SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 103, SEC ID NO: 105, SEC ID NO: 106, SEC ID NO: 107 o una variante de cualquiera de los mismos con al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % de similitud de identidad.

25 En algunas modalidades, el marco VL del dominio de unión a la albúmina es humano (por ejemplo, Vκ1, como 2-1- (1) L5), y comprende, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, como los aminoácidos que son residuos donantes. En tales modalidades, el VL puede tener una secuencia mostrada en la SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 102, SEC ID NO: 108, SEC ID NO: 109, SEC ID NO: 110, o una variante de cualquiera de los mismos con al
30 menos 95, 96, 97, 98 o 99 % de similitud de identidad.

En algunas modalidades, el dominio de unión a albúmina comprende secuencias VH y VL seleccionadas de las combinaciones SEC ID NO: 7 y 2, 7 y 102, 7 y 108, 7 y 109, 7 y 110, 103 y 2, 103 y 102, 103 y 108, 103 y 109, 103 y 110, 105 y 2, 105 y 102, 105 y 108, 105 y 109, 105 y 110, 106 y 2, 106 y 102, 106 y 108, 106 y 109, 106 y 110, 107 y 2, 107 y 102, 107 y 108, 107 y 109, 107 y 110 o una variante o variantes de cualquiera de las mismas con al menos 95, 96, 97, 98 o 99% de similitud o identidad.

En algunas modalidades, las secuencias VL y VH del dominio de unión a albúmina son las SEC ID NO: 102 y SEC ID NO: 103, respectivamente. En algunas modalidades, las secuencias VL y VH del dominio de unión a albúmina son las SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 7, respectivamente.

En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un Fab o scFv. Los dominios VL y VH de las SEC ID NO: 2 y 7 se prefieren para el formato Fab. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un scFv que se une a la albúmina de forma cooperativa con un dominio V (VL o VH) complementario. En tal modalidad, el scFv puede comprender cualquiera de los dominios VH y cualquiera de los dominios VL como se describió anteriormente, enlazados en la orientación VH-VL o VL-VH por un enlazador (G4S)₄ (SEC ID NO: 16). Los dominios VL y VH de las SEC ID NO: 2 y 7 se prefieren para el formato scFv. El dominio VL de la SEC ID NO: 2 puede comprender los dos aminoácidos adicionales RT en el extremo C-terminal. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un scFv que comprende los dominios VL y VH de las SEC ID NO: 2 y 7 separados por un enlazador (G4S)₄. En un ejemplo, el scFv está orientado a VH-VL. En otro ejemplo, scFv está orientado a VL-VH. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un scFv que comprende o tiene la SEC ID NO: 143 como se muestra a continuación. En una modalidad particular, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un dsscFv. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un dsscFv que se une a la albúmina de forma cooperativa con un dominio V (VL o VH) complementario. En tal modalidad, el dsscFv puede comprender cualquiera de los dominios VH y cualquiera de los dominios VL como se describió anteriormente, que comprenden, si no está ya presente, un residuo de cisteína adicional de modo que se pueda formar un enlace disulfuro entre los dominios VL y VH, en donde los dominios VL y VH están enlazados en la orientación VH-

VL o VL-VH por un enlazador (G4S)₄. Los dominios VL y VH de las SEC ID NO: 102 y 103 se prefieren para el formato dsscFv. El dominio VL de la SEC ID NO: 102 puede comprender los dos aminoácidos adicionales RT en el extremo C-terminal. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un dsscFv que comprende los dominios VL y VH de las SEC ID NO: 102 y 103 separados por un enlazador (G4S)₄ (SEC ID NO: 16). En un ejemplo, el dsscFv está orientado a VH-VL. En otro ejemplo, dsscFv está orientado a VL-VH. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es un dsscFv que comprende o tiene la SEC ID NO: 144 como se muestra a continuación.

10

CA645 scFv (VH-VL):

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPS
15 VWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT
YYCGGGYSSISDTTFGQGTKVEIK (SEC ID NO: 143)

CA645 dsscFv (VH-VL) en donde los residuos de cisteína adicionales están subrayados:

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKCLEWIGIIWASGTTF
20 YATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSV
WSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
YCGGGYSSISDTTFGCGTKVEIK (SEC ID NO: 144)

25 En otra modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es una IgG de longitud completa. Los dominios VL y VH de las SEC ID NO: 2 y 7 se prefieren para el formato IgG. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es una IgG1. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es una
30 IgG4. En una modalidad, el anticuerpo que comprende un dominio V que se une a la albúmina sérica humana es una IgG4P.

Se apreciará que se pueden realizar una o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las CDR u otras secuencias (ej., dominios variables) proporcionadas por la presente invención sin alterar significativamente la

capacidad del anticuerpo para unirse a su antígeno afín (ej., HSA). El efecto de cualquier sustitución, adición y/o eliminación de aminoácidos puede ser probado fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden hacer una o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos en la región marco empleada en el anticuerpo o fragmento proporcionado por la presente invención, en donde la afinidad de unión al antígeno afín se retiene o aumenta. En algunas modalidades, el aminoácido en la posición 72 del marco 3 del dominio VH es un aminoácido de tipo silvestre, presente de forma natural en la posición 72 de dicho dominio VH.

Como tal, la presente invención también incluye anticuerpos que comprenden secuencias que son al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% similares o idénticas a una secuencia dada en la presente. "Identidad", como se usa en el presente documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se usa en el presente documento, 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 a menudo pueden sustituirse entre sí 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 y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 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™ disponible de NCBI (Altschul, S.F. , 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. y 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).

El anticuerpo de la presente invención puede unirse a la albúmina con una afinidad de unión suficiente para extender la semivida del polipéptido de inserción, tal como una proteína terapéutica o un segundo anticuerpo, *in vivo*. En una modalidad, el polipéptido de inserción se une a HSA. En tal modalidad, el polipéptido de inserción puede unirse a la albúmina con una afinidad de unión suficiente para extender la semivida del anticuerpo de estructura. Se ha informado que una K_D para la albúmina menor o igual a 2.5 μM extenderá la semivida *in vivo* (Nguyen, A. (2006) Protein Engineering, Design & Selection, 19 (7), 291-297). En un ejemplo, el anticuerpo de la presente invención puede unirse a la albúmina con una alta afinidad de unión que es nanomolar o micromolar, por ejemplo, una K_D igual o menor que 3 nM. La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluida la resonancia de plasmón superficial usando albúmina sérica natural o recombinante.

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción es un péptido de unión a albúmina. Ejemplos de péptidos de unión a albúmina se proporcionan en WO2007/106120 e incluyen:

SEC ID NO:	SECUENCIA
111	DLCLRDWGCLW
112	DICLPRWGCLW
113	MEDICLPRWGCLWGD
114	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
115	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
116	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
117	EDICLPRWGCLWEDD
118	RLMEDICLPRWGCLWEDD
119	MEDICLPRWGCLWEDD
120	MEDICLPRWGCLWED
121	RLMEDICLARWGCLWEDD
122	EVRSFCTRWP AEK SCKPLRG
123	RAPESFVCYWETICFERSEQ
124	EMCYFPGICWM

En una modalidad, el polipéptido de inserción es un segundo anticuerpo que se une a HSA. En tal modalidad, el polipéptido de inserción puede tener las características descritas

anteriormente para el anticuerpo que comprende un dominio V, es decir, el anticuerpo de andamiaje. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción puede comprender al menos una de las CDR, al menos uno de los dominios VL o VH, o al menos una de las cadenas ligeras o pesadas que se unen a la albúmina, como se describe anteriormente. En una
5 modalidad, el polipéptido de inserción comprende al menos una de las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la secuencia SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 5 respectivamente y/o una de las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la secuencia SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 10 respectivamente.

10 **Polipéptido de inserción**

De acuerdo con la presente invención, la presente divulgación está dirigida a anticuerpos que comprenden un polipéptido de inserción dentro de una región 3 del marco en un dominio V. El dominio V puede ser un dominio VL o VH. En un ejemplo, el anticuerpo de la invención
15 puede comprender un polipéptido de inserción dentro de una región 3 del marco tanto de VL como de VH, es decir, el anticuerpo de la invención puede comprender dos polipéptidos de inserción, en donde un polipéptido de inserción se inserta en la región 3 del marco de una VL y un polipéptido de inserción se insertan en la región 3 del marco de una VH, y en donde los polipéptidos de inserción son idénticos, similares o diferentes. En una modalidad, el
20 polipéptido de inserción es heterólogo al anticuerpo. Como se usa en este documento, "heterólogo" generalmente significa derivado de una entidad genotípicamente distinta del resto de la entidad con la que se está comparando. En este contexto, significa que el polipéptido insertado normalmente no estaría presente en la secuencia del anticuerpo nativo. En una modalidad, el polipéptido de inserción es una proteína de longitud completa. En una
25 modalidad, el polipéptido de inserción es un fragmento de una proteína de longitud completa. En una modalidad, el polipéptido de inserción es un fragmento funcional de una proteína de longitud completa. En una modalidad, el polipéptido de inserción es funcional cuando se expresa por sí solo. En una modalidad, el polipéptido de inserción es funcional y/o conserva la funcionalidad cuando está presente en la región 3 del marco en un dominio V del
30 anticuerpo de la invención. Por tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende un dominio variable (V) y un polipéptido de inserción, en donde el polipéptido de inserción está dentro de la región 3 del marco (Fwk3) del dominio V y en donde el polipéptido de inserción es funcional y/o conserva la funcionalidad cuando está presente en la región 3 del marco en el dominio V del anticuerpo de la invención.

En una modalidad, el polipéptido de inserción comprende al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, o 200 aminoácidos. En una modalidad, el polipéptido de inserción comprende menos de 250, 300 o 350 aminoácidos. En una modalidad, el polipéptido de inserción comprende menos de 250 aminoácidos. En una modalidad, el polipéptido de inserción comprende al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, o 200 aminoácidos y menos de 250 aminoácidos. En una modalidad, el polipéptido de inserción comprende entre 50 y 250, preferiblemente 100 y 250, más preferiblemente entre 150 y 250 aminoácidos.

10

En una modalidad, el polipéptido de inserción puede ser un polipéptido terapéutico o de diagnóstico. Los polipéptidos terapéuticos adecuados pueden incluir, por ejemplo, agonistas o antagonistas de receptores, inhibidores de enzimas, quelantes de metales, agentes antivirales, agentes antifúngicos, fármacos cardiovasculares y fármacos quimioterapéuticos. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción es una citocina. La citoquina puede seleccionarse a partir de, por ejemplo, IL-10, IL-15, IL-2, G-CSF, GM-CSF, EPO. En otras modalidades, el polipéptido de inserción es esclerostina. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción comprende más de una secuencia polipeptídica tal como dos copias del mismo polipéptido, opcionalmente enlazadas. De forma ventajosa, en tal modalidad, el polipéptido de inserción puede formar un multímero, en particular un multímero funcional. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción comprende dos, tres o cuatro secuencias polipeptídicas y es capaz de formar un dímero, trímero o tetrámero del polipéptido. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción forma un homodímero, un homotrímero u homotetrámero. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción comprende al menos dos citocinas. En una modalidad, el polipéptido de inserción comprende dos secuencias de IL-10 humana, opcionalmente separadas por un enlazador peptídico, ej., (G4S)₃ (SEC ID NO: 15), es decir, se insertan dos secuencias de IL-10 humana en la región Fwk3 de un dominio V del anticuerpo de la invención. En tal modalidad, las dos secuencias de IL-10 humana forman un homodímero de IL-10 incorporado en el anticuerpo de la invención.

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción es una quimiocina. La quimiocina puede seleccionarse de, por ejemplo, CCL (ligandos de quimiocina de motivo C-C), CXCL (ligandos de quimiocina de motivo CXC). En algunas modalidades, el polipéptido de inserción es una hormona. La hormona puede seleccionarse, por ejemplo, de insulina o leptina. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción es un factor de crecimiento.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la inserción de un polipéptido en un anticuerpo en la región bucle de marco 3 de un dominio V no obstaculiza significativamente la funcionalidad de bien sea el anticuerpo o el polipéptido de inserción.

5 En particular, los ejemplos de este documento muestran que la unión específica y afín a las respectivas pares de unión tanto del anticuerpo como del polipéptido de inserción se observa para varios constructos de proteínas de fusión probadas.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención se une a su antígeno afín mediante
10 dicho dominio V con una afinidad de unión que es al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el anticuerpo sin el polipéptido de inserción presente. Se apreciará que el dominio V que se une al antígeno puede hacerlo solo o en cooperación con otro dominio V dependiendo del formato del anticuerpo, por ejemplo, como un par VH/VL complementario. Por consiguiente, el anticuerpo que comprende un dominio V puede unirse a su antígeno de
15 manera cooperativa con un dominio V (VH o VL) complementario. En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención se une a su antígeno afín con una afinidad de unión que es al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el anticuerpo sin el polipéptido de inserción presente. En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende un dominio VH y une su antígeno cooperativamente con un VL complementario con una
20 afinidad de unión que es de al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el anticuerpo sin el polipéptido de inserción presente. En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende un dominio VL y une su antígeno cooperativamente con un VH complementario con una afinidad de unión que es de al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el anticuerpo sin el polipéptido de inserción presente. En algunas
25 modalidades, la parte del polipéptido de inserción del anticuerpo se une a su par de unión afín con una afinidad de unión que es de al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en comparación con el polipéptido libre cuando no está unido al anticuerpo.

Por lo tanto, en una modalidad, el anticuerpo de la invención comprende un dominio variable
30 (V) y un polipéptido de inserción, en donde el polipéptido de inserción está dentro de la región marco 3 (Fwk3) del dominio V y en donde ambos el anticuerpo comprende un dominio V y el polipéptido de inserción es funcional y/o retiene la funcionalidad cuando el polipéptido de inserción está presente. En tales modalidades, el anticuerpo de la invención tiene funcionalidad tanto del anticuerpo de andamiaje como del polipéptido de inserción. De

manera ventajosa, el anticuerpo de la invención puede ejercer simultáneamente la funcionalidad tanto del anticuerpo de andamiaje como del polipéptido de inserción.

5 El anticuerpo que comprende un dominio variable (V) se considera funcional y/o que retiene funcionalidad cuando el polipéptido de inserción está presente en la región 3 del marco del dominio V, donde el anticuerpo de la invención exhibe al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de al menos una de las funciones del anticuerpo que comprende un dominio variable (V) sin el polipéptido de inserción presente. El polipéptido de inserción se considera funcional y/o que retiene la funcionalidad cuando está presente en la región 3 del marco del dominio V,
10 donde el polipéptido de inserción exhibe al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de al menos una de las funciones del polipéptido de inserción cuando se expresa por sí solo, es decir, cuando se compara con el polipéptido libre cuando no está unido al anticuerpo.

La funcionalidad del anticuerpo y/o el polipéptido de inserción se refiere a al menos una
15 actividad biológica de dicho anticuerpo y/o polipéptido de inserción que incluye, por ejemplo, unión dirigida a diana (ej., unión a antígeno), afinidad de unión, reactividad cruzada, neutralización, semivida en suero, activación de proteínas de la superficie celular, ej., receptores de superficie de células T. Métodos para medir la funcionalidad, ej., afinidad de unión, neutralización y activación de las células diana son bien conocidos en la técnica e
20 incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en los Ejemplos proporcionados en este documento. Por ejemplo, pueden usarse ensayos estándar como el análisis de Scatchard o la técnica de resonancia de plasmón de superficie (ej., usando BIACORE®) para determinar la unión dirigida a diana (ej., unión del antígeno) y afinidad de unión.

25 Sorprendentemente, el dominio V (dominio VL o VH) del anticuerpo de la invención todavía puede formar un dominio de unión funcional con su dominio V correspondiente o complementario (VH o VL), cuando esté presente.

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción puede ser un segundo anticuerpo o un
30 fragmento de unión del mismo. En tales modalidades, el polipéptido de inserción puede tener cualquiera de las características de los anticuerpos como se describió anteriormente. En particular, en algunas modalidades, el polipéptido de inserción es un scFv, un dsscFv, un anticuerpo de dominio único tal como un VH o VL o VHH. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción puede ser un anticuerpo completamente humano, humanizado o

quimérico. El polipéptido de inserción puede estar comprendido por una o más CDR o puede estar compuesto por una o más CDR. Por ejemplo, el polipéptido de inserción puede comprender o consistir en al menos uno de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 y/o CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, opcionalmente enlazados.

- 5 Los expertos en la técnica apreciarán que esto funcionaría como un anticuerpo bivalente o un anticuerpo biespecífico. Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un nuevo formato de anticuerpo bivalente o biespecífico, capaz de unirse simultáneamente a dos epítomos diferentes. En algunos aspectos, los epítomos son epítomos distintos presentes en el mismo antígeno. En otro aspecto, la invención proporciona un nuevo formato de anticuerpo
10 biespecífico capaz de unirse simultáneamente a dos antígenos diferentes.

En una modalidad, un antígeno de interés unido por el primer o segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser una proteína asociada a la célula, por ejemplo, una proteína de la superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura,
15 células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante, tal como las proteínas reguladas positivamente durante una enfermedad o infección, por ejemplo, receptores y/o sus ligandos correspondientes. Ejemplos particulares de proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo, integrinas tales como
20 integrinas $\beta 1$, ej., VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, GDIS, CD19, CD20, CD23, CD25, CD28, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD 134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD 137, CD27L, CDCP1, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAFA1455, FTBP2, FTBP2 nectina-tipo2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6,
25 BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de la grasa de la leche humana (HMFG1 y 2), antígenos MHC Clase I y MHC Clase II y VEGF, y cuando sea apropiado, receptores de los mismos. Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos virales por ejemplo virus respiratorio sincitial o antígenos del citomegalovirus,
30 inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α y PDGF- β y, cuando sea apropiado, receptores de los mismos. Otros

antígenos incluyen antígenos de superficie de células bacterianas, toxinas bacterianas, virus tales como influenza, EBV, Hep A, B y C, agentes bioterroristas, radionúclidos y metales pesados y venenos y toxinas de serpientes y arañas.

- 5 En algunas modalidades, ni el anticuerpo de andamiaje ni el polipéptido de inserción se unen al hapteno (4-hidroxi-3-nitrofenil)acetilo (NP) o al hapteno (4-hidroxi-5-yodo-3-nitrofenil) acetilo (NIP). En algunas modalidades, el anticuerpo es diferente del anticuerpo murino BI-8.

10 En una modalidad, el segundo anticuerpo se une a un antígeno diferente al dominio V del anticuerpo.

En otras modalidades, el segundo anticuerpo se une al mismo antígeno que el dominio V del anticuerpo. Preferiblemente, el segundo anticuerpo se une a un epítipo diferente en comparación con el dominio V del anticuerpo. En tales modalidades, el anticuerpo puede
15 unirse a su antígeno afín con una afinidad de unión que es mayor que cuando se compara con el anticuerpo sin el segundo anticuerpo presente.

En una modalidad, el polipéptido de inserción es un segundo anticuerpo que se une a IL-17, en particular a IL-17A. En una modalidad, el polipéptido de inserción es un segundo
20 anticuerpo que se une a IL-17AA, IL-17AF e IL-17FF. En una modalidad, el segundo anticuerpo que se une a IL-17 es un scFv. En una modalidad, el segundo anticuerpo que se une a IL-17 es un dsscFv. En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab que se une tanto a HSA como a IL-17, en particular el anticuerpo que comprende un dominio V se une a HSA y el polipéptido de inserción es un dsscFv que se une
25 a IL-17, es decir, el anticuerpo de andamiaje es un fragmento Fab que se une a HSA y el segundo anticuerpo insertado en la región Fwk3 del dominio V del anticuerpo de andamiaje es un dsscFv que se une a IL-17. En otra modalidad, el anticuerpo de la invención es una IgG total que se une tanto a HSA como a IL-17, en particular el anticuerpo que comprende un dominio V se une a HSA y el polipéptido de inserción es un dsscFv que se une a IL-17, es
30 decir, el anticuerpo de andamiaje es una IgG completa que se une a HSA y el segundo anticuerpo insertado en la región Fwk3 del dominio V del anticuerpo de andamiaje es un dsscFv que se une a IL-17. En una modalidad, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que comprende o tiene las cadenas pesada y ligera de la SEC ID NO: 129 (cadena pesada de CA645 Fab con CA497 dsscFv (vHvL) insertado en el marco 3) y SEC ID NO: 1

respectivamente, o una variante o variantes de cualquiera de los mismos con al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de similitud o identidad siempre que conserve su funcionalidad, ej., unión a HSA y/o IL-17. En una modalidad, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que comprende o tiene las cadenas pesada y ligera de la SEC ID NO: 130 (cadena pesada de CA645 Fab con CA497 dsscFv (vLvH) insertado en el marco 3) y SEC ID NO: 1 respectivamente, o una variante o variantes de cualquiera de los mismos con al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de similitud o identidad siempre que conserve su funcionalidad, ej., unión a HSA y/o IL-17. En una modalidad, el anticuerpo de la invención es una IgG completa que comprende o tiene las cadenas pesada y ligera de la SEC ID NO: 131 (cadena pesada de CA645 IgG4P con CA497 dsscFv (vHvL) insertado en el marco 3) y SEC ID NO: 1 respectivamente, o una variante o variantes de cualquiera de los mismos con al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de similitud o identidad siempre que conserve su funcionalidad, ej., unión a HSA y/o IL-17. En una modalidad, el anticuerpo de la invención es una IgG completa que comprende o tiene las cadenas pesada y ligera de la SEC ID NO: 132 (cadena pesada de CA645 IgG4P con CA497 dsscFv (vLvH) insertado en el marco 3) y SEC ID NO: 1 respectivamente, o una variante o variantes de cualquiera de los mismos con al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de similitud o identidad siempre que conserve su funcionalidad, ej., unión a HSA y/o IL-17.

En una modalidad, el anticuerpo de la invención se une tanto a CD3 como a CD28. En una modalidad, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que se une tanto a CD3 como a CD28, en particular el anticuerpo que comprende un dominio V se une a CD3 y el polipéptido de inserción es un dsscFv que se une a CD28, es decir, el anticuerpo de andamiaje es un fragmento Fab que se une a CD3 y el segundo anticuerpo insertado en la región Fwk3 del dominio V del anticuerpo de andamiaje es un dsscFv que se une a CD28. En una modalidad, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que se une tanto a CD3 como a CD28, en particular el anticuerpo que comprende un dominio V se une a CD28 y el polipéptido de inserción es un dsscFv que se une a CD3, es decir, el anticuerpo de andamiaje es un fragmento Fab que se une a CD28 y el segundo anticuerpo insertado en la región Fwk3 del dominio V del anticuerpo de andamiaje es un dsscFv que se une a CD3. En otra modalidad, el anticuerpo de la invención es una IgG completa que se une tanto a CD3 como a CD28, en particular el anticuerpo que comprende un dominio V se une a CD3 y el polipéptido de inserción es un dsscFv que se une a CD28, es decir, el anticuerpo de andamiaje es una IgG total que se une a CD3 y el segundo anticuerpo insertado en la región Fwk3 del

dominio V del anticuerpo de andamio es un dsscFv que se une a CD28. En otra modalidad, el anticuerpo de la invención es una IgG completa que se une tanto a CD3 como a CD28, en particular el anticuerpo que comprende un dominio V se une a CD28 y el polipéptido de inserción es un dsscFv que se une a CD3, es decir, el anticuerpo de andamio es una IgG total que se une a CD28 y el segundo anticuerpo insertado en la región Fwk3 del dominio V del anticuerpo de andamio es un dsscFv que se une a CD3. En una modalidad, el anticuerpo de la invención es un fragmento Fab que comprende o tiene las cadenas pesada y ligera de la SEC ID NO: 139 (cadena pesada anti-CD28 Fab con anti-CD3 dsscFv insertado en el marco 3) y SEC ID NO: 136 respectivamente, o una variante o variantes de cualquiera de los mismos con al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de similitud o identidad siempre que conserve su funcionalidad, ej., unión a CD3 y/o CD28. En otra modalidad, el anticuerpo de la invención es una IgG completa que comprende o tiene las cadenas pesada y ligera de la SEC ID NO: 141 (cadena pesada anti-CD28 IgG4P con anti-CD3 dsscFv insertado en el marco 3) y SEC ID NO: 136 respectivamente, o una variante o variantes de cualquiera de los mismos con al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de similitud o identidad siempre que conserve su funcionalidad, ej., unión a CD3 y/o CD28.

Las secuencias de ejemplo para su uso en la presente invención incluyen la SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 54, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 64, SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 66, SEC ID NO: 67, SEC ID NO: 68, SEC ID NO: 69, SEC ID NO: 70, SEC ID NO: 71, SEC ID NO: 72, SEC ID NO: 73, SEC ID NO: 74, SEC ID NO: 75, SEC ID NO: 76, SEC ID NO: 83, SEC ID NO: 84, SEC ID NO: 85, SEC ID NO: 86, SEC ID NO: 87, SEC ID NO: 88, SEC ID NO: 89, SEC ID NO: 90, SEC ID NO: 91, SEC ID NO: 92, SEC ID NO: 93, SEC ID NO: 94, SEC ID NO: 95, SEC ID NO: 96, SEC ID NO: 97, SEC ID NO: 98, SEC ID NO: 99, SEC ID NO: 100, SEC ID NO: 101, SEC ID NO: 102, SEC ID NO: 103, SEC ID NO: 105, SEC ID NO: 106, SEC ID NO: 107, SEC ID NO: 108, SEC ID NO: 109, SEC ID NO: 110, SEC ID NO: 125, SEC ID NO: 126, SEC ID NO: 127, SEC ID NO: 128, SEC ID NO: 129, SEC ID NO: 130, SEC ID NO: 131, SEC ID NO: 132, SEC ID NO: 133, SEC ID NO: 134, SEC ID NO: 135, SEC ID NO: 136, SEC ID NO: 137, SEC ID NO: 138, SEC ID NO: 139, SEC ID NO: 140, SEC ID NO: 141, SEC ID NO: 142, SEC ID NO: 143 y SEC ID NO: 144. Las combinaciones de ejemplo de cadenas pesadas y ligeras para su uso en los fragmentos Fab de la presente invención incluyen SEC ID NO: 54 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 56 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 58 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 60 y

SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 61 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 63 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 64 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 66 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 68 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 70 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 73 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 74 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 75 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 76 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 93 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 94 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 95 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 101 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 129 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 130 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 139 y SEC ID NO: 136, SEC ID NO: 140 y SEC ID NO: 133. Ejemplos de combinaciones de cadenas pesadas y ligeras para usar en la IgG total de la presente invención incluyen la SEC ID NO: 131 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 132 y SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 141 y SEC ID NO: 136, SEC ID NO: 142 y SEC ID NO: 133.

Secuencia enlazadora

En algunas modalidades, el polipéptido de inserción se une directamente a la región 3 del marco del anticuerpo. Enlazada directamente como se emplea en el presente documento pretende referirse al hecho de que los aminoácidos N- y C-terminales del polipéptido de inserción heterólogos estarían unidos por un enlace peptídico a la región 3 del marco del dominio V del anticuerpo de la presente invención.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende además una secuencia enlazadora. En tales modalidades, la secuencia enlazadora es preferiblemente heteróloga tanto para el anticuerpo como para el polipéptido de inserción, es decir, la secuencia enlazadora no estaría normalmente presente en la secuencia del anticuerpo nativo o el polipéptido de inserción en esa posición.

En algunas modalidades, la secuencia enlazadora comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve, treinta o treinta y un aminoácidos que se unen al extremo N- y/o C-terminal del polipéptido de inserción a la región 3 del marco. En algunas modalidades, la secuencia enlazadora comprende entre uno y treinta y uno, o entre cinco y treinta y uno, o entre seis y veintiocho, o entre diez y veintiséis, o entre quince y veintiséis, o entre diez y veintiuno o entre cinco y diez aminoácidos que unen el extremo N- y/o C-terminal del polipéptido de inserción a la región 3 del marco.

En algunas modalidades, la secuencia enlazadora comprende como máximo treinta aminoácidos que unen el extremo N- y/o C-terminal del polipéptido de inserción a la región 3 del marco.

5

En algunas modalidades, el enlazador en el extremo N-terminal del polipéptido de inserción es diferente en composición y/o longitud al enlazador en el extremo C-terminal del polipéptido de inserción. En algunas modalidades, el enlazador en el extremo N-terminal del polipéptido de inserción es idéntico o similar en composición y/o longitud al enlazador en el extremo C-terminal del polipéptido de inserción. En algunas modalidades, la secuencia enlazadora se deriva de una secuencia humana. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador humano. En algunas modalidades, la secuencia enlazadora se deriva de una secuencia no humana. En algunas modalidades, el enlazador se deriva de una secuencia bovina. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador bovino.

10

15

Ejemplos de regiones enlazadoras adecuadas para enlazar el polipéptido de inserción a la región 3 del marco de un dominio V incluyen, pero no se limitan a, secuencias enlazadoras flexibles y secuencias enlazadoras rígidas. Las secuencias enlazadoras flexibles incluyen las descritas en Huston, 1988, PNAS 85: 5879-5883; Wright y Deonarain, Mol. Immunol., 2007, 44(11):2860-2869; Alfthan, Prot. Eng., 1995, 8(7):725-731; Luo, J. Biochem., 1995, 118(4):825-831; Tang, 1996, J. Biol. Chem. 271 (26): 15682-15686; y Turner, 1997, JIMM 205, 42-54 (véase la Tabla 1 a continuación para ejemplos representativos).

20

Tabla 1: Ejemplos de secuencias enlazadoras flexibles

SEC ID NO:	SECUENCIA
11	SGGGGSE
12	DKTHTS
13	(S)GGGGS
14	(S)GGGSGGGGS
15	(S)GGGSGGGGSGGGGS
16	(S)GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
17	(S)GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
18	AAAGSG-GASAS
19	AAAGSG-XGGGS-GASAS
20	AAAGSG-XGGGSXGGGS-GASAS
21	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
22	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS

23	AAAGSG-XS-GASAS
24	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
25	ATTTGSSPGPT
26	ATTTGS
-	GS
27	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
28	GTVAAPSVFIFPPSD
29	GGGGIAPSMVGGGGS
30	GGGGKVEGAGGGGGS
31	GGGGSMKSHDGGGGS
32	GGGGNLITIVGGGGS
33	GGGGVVPSLPGGGGS
34	GGEKSIPGGGGS
35	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
36	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
37	TPSHLSHILPSFGLPTEN
38	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
39	SPAAHFPRSIPRPGPIRT
40	APGPSAPSHRSLPSRAFG
41	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
42	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
43	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
44	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
45	LPWRTSLLPSLPLRRRP
46	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
47	VPPAPVVSLRSAHARPPY
48	LRTPPRVRSYTCCPTP-
49	PNVAHVLPLLTVPWDNLR
50	CNPLLPLCARSPAVRTFP
77	KYQSGGSGMG
78	SGGSYTY
79	GGGSGGGG
80	GSSSSGS
-	GGG
81	SGGGG
-	S

(S) es opcional en las secuencias 13 a 17. X representa cualquier residuo.

En modalidades particulares, el anticuerpo comprende las secuencias enlazadoras SEC ID NO: 106 y 107.

5

Ejemplos de enlazadores rígidos incluyen las secuencias peptídicas GAPAPAAPAPA (SEC ID NO: 51), PPPP (SEC ID NO: 52), PPP, IPFTV (SEC ID NO: 82) y EYHGLQ (SEC ID NO: 104). Otros ejemplos incluyen secuencias derivadas del tallo alargado de CDRH3 de

anticuerpos bovinos (Wang, Cell, 2013, 153:1379-1393); secuencias preferibles incluyen secuencias enlazadoras largas tales como TSVHQETKKYQS (SEC ID NO: 96) y SYTYNYEWHVDV (SEC ID NO: 97) (que comprende residuos tanto expuestos como enterrados al disolvente de un tallo de CDH3 bovino); y secuencias de enlazadoras cortas
5 tales como ETKKYQS (SEC ID NO: 98) y SYTYNYE (SEC ID NO: 99) (que comprende solamente los residuos expuestos al disolvente de un tallo de CDH3 bovino).

En algunas modalidades, se pueden usar variantes de cualquiera de las secuencias enlazadoras descritas en el presente documento, por ejemplo, variantes donde uno, dos, tres,
10 cuatro o más residuos de aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado con respecto a la secuencia enlazadora original. Las variantes de secuencias enlazadoras también pueden incluir variantes repetidas, donde la secuencia enlazadora se alarga al repetir la secuencia enlazadora. En una modalidad, una secuencia enlazadora preferida que se repite es la SEC ID NO: 13, que conduce al motivo: $(G_mS)_n$, donde m es 4 y n puede ser cualquier número
15 entero (por ejemplo, 1, 2 o 3). En otras modalidades, m puede ser un número entero diferente de 1 a 10.

Ya sea que el polipéptido de inserción esté unido directamente o mediante una secuencia enlazadora, en algunas modalidades, uno o más aminoácidos en la región 3 del marco pueden
20 eliminarse como resultado de la unión de la inserción polipeptídica. En algunas modalidades, el polipéptido de inserción está entre los residuos de aminoácidos 73 y 75 del dominio VH, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, y el aminoácido en la posición 74 está eliminado.

25 **Composiciones farmacéuticas y métodos de uso.**

Los anticuerpos de la invención y como se describen en el presente documento son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos que incluyen enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos inmunitarios, trastornos fibróticos y cánceres.

30 El término "enfermedad inflamatoria" o "trastorno" y "enfermedad o trastorno inmunológico" incluye artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Still, enfermedad de Muckle Wells, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LES (lupus eritematoso sistémico),

asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mellitus tipo I, trasplante y enfermedad de injerto contra huésped.

El término "trastorno fibrótico" incluye fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerosis sistémica (o esclerodermia), fibrosis renal, nefropatía diabética, nefropatía por IgA, hipertensión, enfermedad renal terminal, fibrosis peritoneal (diálisis peritoneal ambulatoria continua), cirrosis hepática, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), retinopatía, fibrosis reactiva cardíaca, cicatrices, queloides, quemaduras, úlceras cutáneas, angioplastia, cirugía de bypass coronario, artroplastia y cirugía de cataratas.

El término "cáncer" incluye un nuevo crecimiento maligno que surge del epitelio, que se encuentra en la piel o, más comúnmente, en el revestimiento de los órganos del cuerpo, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y diseminarse (hacer metástasis) en órganos distantes, por ejemplo: en huesos, hígado, pulmones o el cerebro.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención en asociación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

También se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Más preferiblemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden, por ejemplo, tomar una forma adecuada para la administración parenteral, subcutánea u oftálmica. Cuando sea apropiado, por ejemplo, si el anticuerpo se une a la albúmina a través de su dominio V, puede ser deseable formular previamente el anticuerpo de la invención con albúmina sérica humana o recombinante, usando cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Cuando la formulación farmacéutica es un líquido, por ejemplo una solución o suspensión, entonces la formulación puede comprender además albúmina, por ejemplo, albúmina sérica humana, en particular albúmina recombinante tal como albúmina sérica humana recombinante. Las cantidades adecuadas pueden estar en el intervalo de menos del 2% p/p de

la formulación total, en particular menos del 1, 0.5 o 0.1% p/p. Esto puede ayudar a estabilizar el componente de anticuerpo en la formulación. La composición farmacéutica puede liofilizarse para su posterior reconstitución con un disolvente acuoso. En una modalidad, se proporciona un recipiente de dosis unitaria, tal como un vial, que comprende un anticuerpo liofilizado según la invención.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, ej., por inyección en bolo o infusión. Las formulaciones para inyección pueden estar presentes en forma de dosificación unitaria, ej., en ampollas de vidrio o envases multidosis, ej., viales de vidrio. Las composiciones para inyección pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstituirlo con un vehículo adecuado, ej., agua estéril sin pirógenos, antes de su uso.

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración.

Los formatos de anticuerpos de la invención pueden administrarse dispersos en un disolvente, ej., en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica apropiada, ej., solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0.05 mg a 0.15 mg de edetato de disodio, de 8.0 mg a 9.0 mg de NaCl, de 0.15 mg a 0.25 mg de polisorbato, de 0.25 mg a 0.30 mg de ácido cítrico anhidro y de 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. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, un anticuerpo liofilizado.

Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (ej., tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (ej., albúmina sérica),

EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. 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 estériles.

5

Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente / solución tamponada utilizada para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución disolvente tamponada estéril y dispensación de la formulación en receptáculos estériles mediante métodos familiares para los expertos en la técnica.

10

La cantidad requerida de un anticuerpo de la invención para la profilaxis o el tratamiento de una condición particular variará dependiendo del anticuerpo y la condición a tratar. En general, sin embargo, las dosis diarias pueden variar de 10 ng/kg a 1000 mg/kg, de 100 ng/kg a 100 mg/kg, o de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal aproximadamente.

15

La presente invención también proporciona métodos y composiciones para la administración de los anticuerpos como se describe en el presente documento mediante terapia génica, particularmente mediante un vector de virus adenoasociado (AAV).

20

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector viral que tiene una cápside viral y un genoma artificial que comprende un casete de expresión flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en donde el casete de expresión comprende un transgén que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo como se describe aquí. Las secuencias de ITR pueden usarse para empaquetar el genoma artificial que comprende las secuencias polinucleotídas que codifican el anticuerpo como se describe en el presente documento en el virión del vector viral.

25

El transgén en el casete de expresión está operativamente enlazado a elementos de control de expresión tales como promotores que controlarán la expresión del transgén en células humanas.

30

El vector viral es preferiblemente un vector viral basado en AAV. Se han descrito en la técnica una variedad de cápsidas de AAV. Los métodos para generar vectores AAV también se han descrito extensamente en la literatura (ej., WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; Patente de EE.UU. No. 7,588,772 B2). La fuente de cápsides de AAV puede

seleccionarse de un AAV que se dirige a un tejido deseado. Por ejemplo, AAV adecuado puede incluir, ej., AAV9 (patente de EE.UU. N° 7.906.111; US 2011-0236353-A1), rh10 (WO 2003/042397) y/o hu37 (US 7,906,111B2; US20110236353). Sin embargo, también se pueden seleccionar otros AAV, incluidos, ej., AAV1, AAV2, AAV-TT, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 y AAV.PHP.B (o variantes de los mismos) y otros.

Los métodos para generar y aislar vectores virales de AAV adecuados para la administración a un sujeto son conocidos en la técnica (US7,790,449B2; US7,282,199B2; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; y US7,588,772 B2).

La composición farmacéutica que comprende un vector viral que tiene una cápside viral y un genoma artificial según la invención está diseñada para asegurar que se expresen tanto la cadena pesada como la ligera. Las secuencias polinucleótidas de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden modificarse en un constructo único y separarse, por ejemplo, por un elemento enlazador escindible o un elemento de sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) de modo que las cadenas pesada y ligera se expresan por separado. En algunas modalidades, el enlazador escindible es un enlazador de furina/F2A autoescindible (Fang, Nature Biotechnology 23: 584-590, 2005 y Fang, Mol Ther 15: 1153-9, 2007). Por ejemplo, puede incorporarse un enlazador de furina/F2A en un casete de expresión para separar las secuencias de codificación de polinucleótidos de cadena pesada y ligera.

En algunas otras modalidades, la secuencia de polinucleótidos de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se conecta a través de un enlazador flexible no escindible. En algunas modalidades, tal enlazador puede ser un enlazador de péptido flexible, como los que codifican scFv (compuestos de Gly y Ser), de modo que los dominios de cadena pesada y ligera pueden moverse libremente entre sí.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

Metodología general

Inserción del marco 3

Además de los tres bucles de CDR, las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, tanto VHH de camélido de cadena única como convencional, tienen un cuarto bucle que está formado por el marco 3 (Figura 1A). El sistema de numeración de Kabat define el marco 3 como las posiciones 66-94 en una cadena pesada y las posiciones 57-88 en una cadena ligera.

5

Diseño de genes y expresión celular transitoria

Los genes que codifican las regiones V de cadena ligera y pesada, incluidas las variantes con una inserción de marco 3, se diseñaron y construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizada (ATUM).

Los genes se clonaron en vectores de expresión que contenían ADN que codificaba la región C κ humana (alotipo Km3) y la región γ 1 CH1 de cadena pesada, respectivamente. Luego, los vectores de expresión de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células HEK293 y las moléculas de proteína de fusión Fab / de anticuerpo recombinante se cribaron utilizando un ensayo de unión a SPR.

La región V ligera o cadena ligera de las proteínas de fusión CA645 Fab descritas en los siguientes Ejemplos comprendía o tenía la SEC ID NO: 2 (dominio VL de CA645 (gL5)) o SEC ID NO: 1 (cadena ligera de CA645 gL5) respectivamente. Se pueden usar cadenas ligeras alternativas o regiones V ligeras, por ejemplo, regiones V ligeras que comprenden el dominio VL de la SEC ID NO: 108 o SEC ID NO: 109.

Determinación de la potencia de unión de la proteína de fusión de anticuerpo/Fab por resonancia de plasmón superficial

Todos los experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) se llevaron a cabo a 25 °C en un sistema Biacore 3000 usando un tampón de corrido de pH 7.4 que contenía HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y 0.005 % (v/v) P20 (tampón HBS-EP).

El fragmento policlonal de cabra F(ab)₂ anti-humano F(ab)₂ (código de producto de Jackson Labs # 109-006-097) se inmovilizó en la superficie de los chips del sensor CM5 (GE Healthcare) mediante el acoplamiento de aminas. Brevemente, la superficie de carboximetil dextrano se activó con una mezcla fresca 1:1 (v/v) de N-hidroxisuccimida 50 mM y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida 200 mM durante 5 minutos a una tasa de flujo de 10 μ L/min. El F(ab)₂ anti-humano en tampón de acetato 10 mM pH 5.0 se acopló covalentemente a los chips a 50 μ g/ml en un pulso de 10 minutos a la misma tasa de flujo.

Finalmente, la superficie se desactivó con un pulso de 10 minutos de etanolamina HCl 1 M pH 8.5. Se preparó una celda de flujo de referencia en el chip al omitir la proteína del procedimiento anterior.

- 5 Los sobrenadantes que contenían los constructos de inserto Fab-bucle, Fab de tipo silvestre o sobrenadantes de control se diluyeron 1 en 5 en tampón HPS-EP antes de ensayar la unión de su respectivo ligando o receptor.

- 10 La albúmina sérica humana (HSA) se suministró por Jackson ImmunoResearch (nº de catálogo 009-000-051) y se diluyó en tampón HBS-EP a 1000 nM. Las siguientes citocinas y receptores se obtuvieron de R&D Systems Ltd.: IL-15, IL-15-R α -hFc, IL-2, IL-2-sR β , G-CSF, G-CSF-R α , GM-CSF, GM-CSF-R α , EPO, EPO-R, IL-6, LRP4(ecd)-hFc, LRP6(ecd)-hFc, Lisozima, KLK5. Estas proteínas se reconstituyeron típicamente a 100 μ g/ml y se almacenaron a -20 °C. Con fines experimentales, se diluyeron recientemente en tampón
15 HBS-EP hasta 50, 100 o 200 nM típicamente.

- 20 Un ciclo típico de SPR comprendía una tasa de flujo de 10 μ l/min con HBS-EP como tampón de corrido y se inyectaba sobrenadante diluido durante 1 min para capturar la proteína de fusión anticuerpo/Fab. Esto fue seguido por una inyección de 30 μ l del ligando o receptor afín diluido o control de tampón. La fase de disociación posterior se controló durante al menos 3 min. En algunos experimentos, se incluyó una inyección adicional de 30 μ l del antígeno afín relevante de la porción de anticuerpo, HSA en el caso de constructos de proteína de fusión que usan CA645 Fab como la porción de polipéptido de anticuerpo. En algunos experimentos se incluyó un ciclo de control de especificidad donde el
25 receptor/ligando afín (la porción de inserción de la proteína de fusión anticuerpo/Fab) se premezclaba con un exceso molar de 2 veces de su compañero de unión. Cada ciclo terminó con una etapa de regeneración que comprendía dos inyecciones de 10 μ L de HCl 40 mM intercaladas con una inyección de 5 μ L de NaOH 5 mM.

- 30 Los puntos de informe se recogieron 10 s antes de las inyecciones de sobrenadante y ligando/receptor para medir la captura del constructo de la proteína de fusión y 5 s antes y 15 s después de finalizar la inyección de ligando/receptor para evaluar la unión del ligando/receptor afín. Los datos del sensorgrama y del punto de informe recolectados

representaron la diferencia en unidades de resonancia (RU) entre la celda de flujo de captura policlonal y la celda de flujo de referencia.

Los datos del punto de informe y del sensorgrama se procesaron al restar el ciclo de control respectivo del ciclo de ligando/receptor para tener en cuenta cualquier disociación lenta del constructo de proteína de fusión de la superficie de captura. En cada experimento, se incluyó el sobrenadante Fab de tipo silvestre respectivo para comprobar cualquier unión no específica de ligando/receptor. Si es significativo, se restó de lo anterior.

En los ejemplos donde se estimaron las constantes de disociación (K_D), el método anterior se modificó al aumentar la tasa de flujo a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Seguido de la captura del constructo Fab, se inyectaron 90 μl del ligando afín o control de tampón seguido de una fase de disociación de 180 segundos. Se probó una unión de ligando en un intervalo de concentraciones (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 nM). Los sensorgramas se corrigieron para la desviación mediante la sustracción de un sensorgrama de ligando cero y para la interacción no específica mediante la sustracción del sensorgrama corregido por Fab de tipo silvestre. Las constantes de afinidad se calcularon a partir de constantes de tasa de asociación y disociación separadas que se ajustaron a los sensogramas corregidos utilizando el modelo Langmuir del software BIAevaluation (versión 4.1.1).

EJEMPLO 1 - Fab CA645 con polipéptido de inserción IL-15

La interleucina 15 (IL-15) es una citocina que desempeña un papel en la respuesta inmune y funciona para promover la proliferación de células T y células asesinas naturales (NK). Es estructuralmente similar a IL-2 y su receptor comparte cadenas comunes con el receptor de IL-2.

Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar la secuencia de IL-15 humana en la región 3 del marco del constructo Fab CA645, como se muestra a continuación.

Secuencia de IL-15 humana:

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDAS
IHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN (SEC ID
NO: 53)

- 5 *Cadena pesada de Fab CA645 con IL-15 humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3, enlazadores subrayados:*

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNKYQSGSGMGN***NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV***
HPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASI***HDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE***
10 ***ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN******SGGSYTYKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVP***
GYSTAPYFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSC (SEC ID NO: 54)

- 15 La Figura 2A muestra el análisis de Biacore de la potencia de unión para esta proteína de fusión de anticuerpo CA645/IL-15 cuando se prueba con IL-2-R β , IL-15-R α 100 nM (ambas de las cuales son pares de unión para IL-15) y 1000 nM HSA (ligando para CA645). Como se ve claramente en la Figura 2A, se observó la unión a los tres ligandos mostrando que la funcionalidad se retiene tanto en la porción de CA645 Fab como en el injerto de IL-15 en la
20 región 3 del marco. La Figura 2B muestra una representación modelada de la proteína CA645/IL-15_{Fwk3}.

EJEMPLO 2 - Fab CA645 con polipéptido de inserción IL-2

- 25 La interleucina 2 (IL-2) es una citocina pluripotente producida principalmente por células T CD4⁺ activadas, que desempeña un papel crucial en la generación de una respuesta inmune normal. La IL-2 promueve la proliferación y expansión de los linfocitos T activados, potencia el crecimiento de las células B y activa los monocitos y células asesinas naturales.
- 30 Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar la secuencia de IL-2 humana en la región 3 del marco del constructo Fab CA645, como se muestra a continuación.

Secuencia de IL-2 humana:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFCQSIISTLT (SEC ID NO: 55)

- 5 *Cadena pesada de Fab CA645 con IL-2 humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3, enlazadores subrayados:*

EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSSGGSGGGG***APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK***
NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI
10 ***NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT***GGGKNTVYLQMNSL
RAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 56)

- 15 La Figura 3A muestra el análisis de Biacore de la potencia de unión para esta proteína de fusión de anticuerpo CA645/IL-2 cuando se prueba con IL-2-R β 100 nM (par de unión para IL-2), con y sin incubación previa con IL-15 200 nM (un ligando competidor). Como se muestra en la Figura 3A, la unión observada a IL-2-R β se elimina en presencia del ligando competidor en exceso molar, lo que muestra que la unión observada a la porción de IL-2 en el
20 marco 3 de la proteína de fusión es una interacción funcional genuina y no inespecífica. La Figura 3B muestra una representación modelada de la proteína CA645/IL-2_{Fwk3}.

EJEMPLO 3 - CA645 Fab con polipéptido de inserción G-CSF

- 25 El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citocina producida por varios tipos de células diferentes (ej., endotelio, macrófagos) que actúa para simular la producción de granulocitos maduros a partir de la médula ósea.

- Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para
30 insertar la secuencia de G-CSF humano en la región 3 del marco del constructo de CA645 Fab, como se muestra a continuación.

Secuencia de G-CSF humano:

ATPLGPASSLPQSFLCLKLEQVRKIQGDGAALQEKL VSECATYKLCHPEELVLLGHSL
GIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVAD
FATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVL
RHLAQP (SEC ID NO: 57)

5

Cadena pesada de CA645 Fab con G-CSF humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGGG***ATPLGPASSLPQSFLCLKLEQVRKIQGDGAALQEK***
10 ***LVSECATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGFLYQGLL***
QALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQ
RRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP***SGGGG******KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC***
ARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
15 SNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 58)

La Figura 4A muestra el análisis de Biacore de la potencia de unión para esta proteína de fusión de anticuerpos CA645/G-CSF cuando se prueba con G-CSF-R α 100 nM (par de unión para G-CSF), HSA 1000 nM (ligando para CA645) y ambos G -CSF-R α y HSA. La Figura
20 4A muestra, en línea con los otros Ejemplos, que tanto las porciones de G-CSF como de Fab de la proteína de fusión son funcionalmente activas y pueden unirse a sus respectivos pares de unión. La Figura 4A muestra además que, en presencia de ambos pares de unión, la señal observada en la traza de SPR es aditiva de las trazas de un solo aglutinante, mostrando que la unión a ambas porciones funcionales puede ocurrir simultáneamente. La Figura 4B muestra
25 una representación modelada de la proteína CA645/G-CSF_{Fwk3}.

EJEMPLO 4 - CA645 Fab con polipéptido de inserción GM-CSF

GM-CSF es una citocina que estimula a las células madre a producir granulocitos
30 (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos.

Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar las secuencias de GM-CSF humana y murina en la región 3 del marco del constructo CA645 Fab, como se muestra a continuación.

Secuencia de GM-CSF humano (hGM-CSF):

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQT
RLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLL

5 VIPFDCWEPVQE (SEC ID NO: 59)

Cadena pesada de CA645 Fab con GM-CSF humano (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlaces Gly-Ser subrayados:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
10 FYATWAKGRFTISRDNSGGGSGGG**APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDT
AAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHC
PPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE**GGGKNTVYLQMNSLRAED
TAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYIC

15 NVN HKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 60)

Cadena pesada de CA645 Fab con GM-CSF humano (negrita y cursiva) en el extremo C-terminal de CH1, enlace Gly-Ser subrayado (para fines de comparación):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
20 FYATWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWG
QGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCGG
GSGGGG**APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQ
EPTCLQTRLELYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKE**

25 **NLKDFLLVIPFDCWEPVQE** (SEC ID NO: 61)

Secuencia de GM-CSF murino (mGM-CSF):

APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLT CVQTRLKI
FEQGLRG NFTKLKGALNMTASY YQTYCPPTPETDCETQVT TYAD FIDSLKTFLTDIPF
30 ECKKPGQK (SEC ID NO: 62)

Cadena pesada de CA645 Fab con GM-CSF murino (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlaces Gly-Ser subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
 FYATWAKGRFTISRDNSGGGSGGG***APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVT***
LNEEVEVVSNEFSFKKLTCVQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYYYQTYCPPTP
ETDCETQVTTYAD FIDSLKTFLTDIPFECKKPGQKGGGKNTVY LQMNSLRAEDTAV
 5 YYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 63)

*Cadena pesada de CA645 Fab con GM-CSF murino (negrita y cursiva) en el extremo C-
 10 terminal de CH1, enlazadores Gly-Ser subrayados (para fines de comparación):*

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
 FYATWAKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWG
 QGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCGG
 15 GSGGGG***APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEVEVVSNEFSFKKLTC***
VQTRLKIFEQGLRGNFTKLKGALNMTASYYYQTYCPPTPETDCETQVTTYAD FIDSLKT
FLTDIPFECKKPGQK (SEC ID NO: 64)

Las Figuras 5A y 6 muestran el análisis de Biacore de la potencia de unión para las proteínas
 20 de fusión de anticuerpos CA645/hGM-CSF y CA645/mGM-CSF (respectivamente) cuando
 se prueban con el receptor de GM-CSF afín (a 100 nM). Los resultados demuestran que la
 unión al receptor de GM-CSF es específica y depende de la presencia del polipéptido de
 inserción. Las Figuras también muestran una traza separada para una fusión de dominio
 constante (CH1) del péptido GM-CSF, mostrando que el inserto del marco 3 funciona de una
 25 manera comparable. La Figura 5B muestra una representación modelada de la proteína
 CA645/GM-CSF_{Fwk3}.

EJEMPLO 5 - CA645 Fab con polipéptido de inserción EPO

30 La eritropoyetina (EPO) es una citocina liberada por el riñón en respuesta a la hipoxia celular
 que estimula la producción de glóbulos rojos en la médula ósea.

Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar la secuencia de EPO humano en la región 3 del marco del constructo de CA645 Fab, como se muestra a continuación.

5 *Secuencia de EPO humana:*

APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVG
QQAWEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALG
AQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR (SEC
ID NO: 65)

10

Cadena pesada de CA645 Fab con EPO humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGSGGGG***APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH***
CSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAWEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPW
EPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYS
NFLRGKCLKLYTGEACRTGDRGGGKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAP
YFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP

20

KSC (SEC ID NO: 66)

La Figura 7A muestra el análisis de Biacore de la potencia de unión para esta proteína de fusión de anticuerpo CA645/EPO cuando se prueba con EPO-R 50 nM (par de unión para EPO), con y sin incubación previa con EPO soluble 500 nM en (ligando competidor). La
Figura 7A muestra en línea con los otros Ejemplos, que la porción de EPO de la proteína de fusión es funcionalmente activa y es capaz de unirse a su receptor afín. Además, la
disminución de la señal observada con la incubación previa de EPO muestra la especificidad de la interacción, mientras que el CA645 Fab sin modificar actúa como un control adicional
para demostrar que la unión observada se deriva del injerto de EPO. La Figura 7B muestra
una representación modelada de la proteína CA645/EPO_{Fwk3}.

30

EJEMPLO 6 - Proteína de fusión de anticuerpo/Fab con CA645 Fab con inserción de VHH6

VHH6 es un anticuerpo camélido de cadena pesada de dominio único modificado que se une a un epítipo de unión porque es capaz de unirse al complejo IL-6:gp80, pero no a los componentes individuales por sí solos.

- 5 Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar la secuencia de VHH6 en la región 3 del marco del constructo de CA645 Fab, como se muestra a continuación.

Secuencia VHH6 de camélido:

- 10 DVQFVESGGGSVHAGGSLRLNCATSGYIYSTYCMGWFRQAPGKEREGVAHIYTNSG
RTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLMNSLKPEDTAIYYCAARPSIRCASFSALEYK
DWGQGTQVTVSS (SEC ID NO: 67)

- 15 *Cadena pesada CA645 Fab con VHH6 (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:*

- EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGGSGGGGS**DVQFVESGGGSVHAGGSLRLNCATSGYIYS**
TYCMGWFRQAPGKEREGVAHIYTNSGRTYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLMNSL
KPEDTAIYYCAARPSIRCASFSALEYKDWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSKNTVYLM
20 NSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 68)

- La Figura 8A muestra el análisis de Biacore de la potencia de unión para esta proteína de
25 fusión de anticuerpos CA645/VHH6 cuando se prueba con IL-6 100 nM (control negativo para VHH6 ya que VHH6 se une únicamente al complejo), fusión IL-6/gp80 100 nM (par de unión para VHH6), HSA 1000 nM (par de unión para CA645) y tanto la fusión de IL-6 como HSA juntas. La Figura 8A muestra que, en línea con los otros Ejemplos, tanto las partes VHH6 como CA645 de la proteína de fusión del anticuerpo son funcionalmente activas como
30 fragmentos de unión y son capaces de unirse a sus respectivos pares de unión. La Figura 8A muestra además que en presencia de ambos pares de unión, la señal observada en la traza de SPR es aditiva de las trazas de un solo aglutinante, mostrando que la unión a ambas porciones funcionales puede ocurrir simultáneamente. La Figura 8B muestra una representación modelada de la proteína CA645/VHH6_{Fwk3}.

EJEMPLO 7 - Proteína de fusión de anticuerpo/Fab con CA645 Fab con inserción de VHH15

- 5 VHH15 es un anticuerpo de camélido de cadena pesada de dominio único modificado que reconoce y se une a IL-6.

Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar la secuencia de VHH15 en la región 3 del marco del constructo de CA645 Fab, como
10 se muestra a continuación.

Secuencia VHH15 de camélido:

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVAASGYTGCTYDMRWYRQAPGKEREFVSGIDSD
GRATYADSVKGRFTISQSNAKIAVYLQMDSLKLEDTAMYYCNLQCLRYPGEYYWG
15 QGTQVTVSS (SEC ID NO: 69)

Cadena pesada de CA645 Fab con VHH15, un anticuerpo de dominio de camélido anti-IL-6 (negrita y cursiva), insertado en el marco 3, enlaces Gly-Ser subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
20 FYATWAKGRFTISRDNSGGGSGGGGS**QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVAASGYT**
GCTYDMRWYRQAPGKEREFVSGIDSDGRATYADSVKGRFTISQSNAKIAVYLQMDSL
KLEDTAMYYCNLQCLRYPGEYYWGQGTQVTVSSSGGGSGGGGSSKNTVYLQMNSLR
AEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
25 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 70)

La Figura 9A muestra el análisis de Biacore de la potencia de unión para esta proteína de fusión de anticuerpo CA645/VHH15 cuando se prueba con IL-6 100 nM (ligando para VHH15), HSA 1000 nM (ligando para CA645) y tanto IL-6 como HSA. La Figura 9A
30 muestra que, en línea con los otros Ejemplos, tanto las porciones VHH15 como Fab de la proteína de fusión del anticuerpo son funcionalmente activas como fragmentos de unión y pueden unirse a sus respectivos pares de unión. La Figura 9A muestra además que en presencia de ambos pares de unión, la señal observada en la traza de SPR es aditiva de las trazas de un solo aglutinante, mostrando que la unión a ambas porciones funcionales puede

ocurrir simultáneamente. La Figura 9B muestra una representación modelada de la proteína CA645/VHH15_{Fwk3}.

EJEMPLO 8 - CA645 Fab con polipéptido de inserción de esclerostina

5

La esclerostina es el producto del gen SOST en humanos y participa en el proceso de formación de huesos, y se expresa en gran medida en los osteocitos. La esclerostina funciona como una proteína reguladora en la vía de señalización de Wnt a través de la unión a los correceptores de tipo LRP.

10

Se generaron y expresaron las proteínas de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar el núcleo o la secuencia de esclerostina completa en la región 3 del marco del constructo de CA645 Fab, como se muestra a continuación.

15 *Secuencia de esclerostina de longitud completa madura humana:*

QGWQAFKNDATETIPELGEYPEPPPELENNKTMNRAENGGRPPHHPFETKDVSEYSC
RELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVCSGQC GPARLLPNAIGRGKWWRPSPDFRCIPD
RYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGR
KPRPRARSAKANQAELENAY (SEC ID NO: 71)

20

Secuencia del dominio central de la esclerostina humana:

CRELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVCSGQC GPARLLPNAIGRGKWWRPSPDFRCIP
DRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASCKC (SEC ID NO: 72)

25 *Cadena pesada de CA645 Fab con dominio central de esclerostina humana (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlazadores S sencillos subrayados:*

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSS CRELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVCSGQC GPARLLPNA
IGRGKWWRPSPDFRCIP DRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASCKC SKNTVYL

30

QMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 73)

Cadena pesada de CA645 Fab con dominio central de esclerostina humana (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlazadores Gly-Ser (2X G₄S) subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGGSGGGG***CRELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVC******SGQ***
5 ***CGPARLLPNAIGRGKWWRPSGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASC***
KCSGGGGSGGGGSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID
NO: 74)

10

Cadena pesada de CA645 Fab con dominio central de esclerostina humana (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlazadores rígidos subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNIPFTV***CRELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVC******SGQC******CGPARLL***
15 ***PNAIGRGKWWRPSGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASCKCEYHG***
LQKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVT***VSSASTKGPS***
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 75)

20 *Cadena pesada de CA645 Fab con esclerostina humana madura de longitud completa (negrita y cursiva) insertada en el marco 3, enlazadores Gly-Ser (1X G₄S) subrayados:*

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGGG***QGWQAFKND******ATEIIP******ELGEY******PEPPPELENNKTMN***
RAENGGRPPHHPFETKDVSEYSCRELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVC***SGQC******CGPARL***
25 ***LPNAIGRGKWWRPSGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLT***
RFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAYSGGGGSKNTVYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 76)

30

Las Figuras 10A y 11 muestran el análisis de Biacore de potencia para esta proteína de fusión de anticuerpo CA645/esclerostina cuando se prueba como sobrenadante diluido 1 en 5 para la unión a dominios extracelulares inmovilizados de LRP6 y LRP4 respectivamente (pares de unión para esclerostina). Este experimento también investigó los efectos de diferentes

constructos de regiones enlazadoras. Se observó que todos los constructos probados mostraron unión a LRP6 y LRP4. La Figura 10B muestra una representación modelada de la proteína CA645/ Sclerostin_{core-Fwk3}.

5 EJEMPLO 9 - Fab CA645 con polipéptido de inserción de IL-10 (dímero de IL-10)

La interleucina 10 (IL-10), también conocida como factor inhibidor de la síntesis de citocinas humanas (CSIF), es una citocina antiinflamatoria. Generalmente funciona como un homodímero.

10

Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar dos secuencias de IL-10 humana en la región 3 del marco del constructo Fab CA645, como se muestra a continuación.

15 *Secuencia de monómero de IL-10 humana:*

NCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGA
PNCIPCKEPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQ
GRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAGEYK (SEC ID NO: 100)

20

Cadena pesada de CA645 Fab con dos monómeros de IL-10 humana (negrita y cursiva) insertados en el marco 3, enlazadores subrayados:

EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGGSGS***NCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLS***
25 ***TSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKEPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKT***
YRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRIC
CPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAGEYK***GGGGSGGGSGGGG***
SNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGA
PNCIPCKEPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQG
30 ***RCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACH***
LRKATCLLGRSIGLAYE***GGGGSGSK******NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAP***
YFDLWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSC (SEC ID NO: 101)

La Figura 12A muestra el análisis de Biacore de la potencia de unión para esta proteína de fusión de anticuerpo CA645/IL-10 cuando se prueba con receptor IL-10 100 nM (par de unión para IL-10), con y sin incubación previa con IL-10 200 nM (ligando competidor).

- 5 Como se muestra en la Figura 12A, la unión observada al receptor IL-10 se elimina en presencia del ligando competidor en exceso molar, lo que muestra que la unión observada a la porción de IL-10 en el marco 3 de la proteína de fusión es una interacción funcional genuina y no inespecífica. Este resultado también sugiere que los monómeros de IL-10 insertados también pueden formar un dímero funcional dentro del constructo del marco 3. La Figura
- 10 12B muestra una representación modelada de la proteína CA645/IL-10_{Fwk3}.

EJEMPLO 10 - Constructos de inserción de anticuerpo-marco 3 con otros Fabs

- 15 Las proteínas de fusión se generaron y expresaron de acuerdo con los métodos anteriores para insertar la secuencia de IL-15 humana en la región 3 del marco de los constructos Fab CA497 y CA240, como se muestra a continuación.

20 *Secuencia de cadena pesada de anti-IL-17A CA497 Fab (Fab, CH1 de IgG1; dominio variable subrayado; CDR en negrita y cursiva).*

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGVIFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVASINFNAD
ISYYRESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDANRQNYDWFAYWG
QGT***LT******VT******VSS******AST******KG******PS******VF******PL******AP******SS******K******ST******SG******GT******AA******LG******CL******V******K******D******Y******F******PE******P******TV******SV******NS******G******ALT******S***
GV***HT******FP******AV******LQ******SS******GL******Y******SL******SS******V******TV******P******SS******SL******GT******Q******T******Y******I******C******N******V******N******H******K******P******S******N******T******K******V******D******K******K******V******E******P******K******S******C***

25 (SEC ID NO: 125)

Cadena pesada anti-IL-17A CA497 Fab con IL-15 humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGVIFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVASINFNAD

30 ***ISYYRESVKGRFTISRDDSGGGSGGGGNWVN******ISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV***
HP***SC******K******V******T******A******M******K******C******F******L******L******E******L******Q******V******S******L******E******S******G******D******A******S******I******H******D******T******V******E******N******L******I******L******A******N******N******S******L******S******S******N******G******N******V******T******E******S******G******C******K******E******C******E***
E***L******E******E******K******N******I******K******E******F******L******Q******S******F******V******H******I******V******Q******M******F******I******N******G******G******K******N******T******L******Y******L******Q******M******N******S******L******K******T******E******D******T******A******V******Y******Y******C******T******T******D******A******N******R******Q******N******Y***
D***W******F******A******Y******W******G******Q******G******T******L******V******T******V******S******S******A******S******T******K******G******P******S******V******F******PL******AP******SS******K******ST******SG******GT******AA******LG******CL******V******K******D******Y******F******PE******P******TV******SV***

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSC (SEC ID NO: 83)

Secuencia de cadena ligera de anti-IL-17A CA497 Fab:

5 AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASESVSSSMYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYRASN
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSWTAPRTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 84)

10 *Secuencia de cadena pesada de anti-IL-6 CA240 Fab (Fab, CH1 de IgG1; dominio variable
subrayado; CDR en negrita y cursiva):*

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQMRNK***
NYQYGTYYAESLEGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARE***SYYGFTSYWG***
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

15 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
(SEC ID NO: 126)

*Cadena pesada anti-IL-6 CA240 Fab con IL-15 humana (negrita y cursiva) insertada en el
marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:*

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQMRNK
NYQYGTYYAESLEGRFTISRDDSGGGSGGGGNWVN***VISDLKKIEDLIQSMHIDATLY***
TESDVHPSCKVTAMKCFLLQLVISLESGDASIHD***TVENLIILANNSLSSNGNV******TESG***
CKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINGGGGKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARE
YYGFTSYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
25 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSC (SEC ID NO: 85)

Secuencia de cadena ligera anti-IL-6 CA240 Fab:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIGISLSWYQQKPGKAPKLLIYNANNLADGV
30 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSAPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 86)

Las figuras 13 y 14 muestran el análisis de Biacore de la potencia de unión para las proteínas de fusión de anticuerpos CA497/IL-15 y CA240/IL-15 (respectivamente) cuando se prueban con IL-2-R β 100 nM (par de unión para IL-15), con y sin incubación previa con IL-15 (un ligando competidor). Como se muestra en ambos experimentos, la unión observada a IL-2-R β se elimina en presencia del ligando competidor en exceso molar, lo que demuestra que la unión observada a la porción de IL-15 en el marco 3 de las proteínas de fusión es una interacción funcional genuina y no inespecífica.

EJEMPLO 11 - Constructos Fab con un VHH insertado en el marco 3

HyHEL5 es un Fab anti-lisozima con las siguientes secuencias:

Cadena pesada HyHEL5:

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGYTFS Δ YWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGS
 TNYHERFKGKATFTADTSSSTAYMQLNSLTSEDSGVYYCLHGNYDFD Δ GWGQGTTLT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT Δ SVWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSV Δ TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO:
 87)

Cadena ligera HyHEL5:

DIVLTQSPA Δ IMASAPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
 VPVRFSGSGSGTSYSLTISMETEDAATYYCQWGRNPTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 88)

D3L11 es un VHH anti-lisozima con la siguiente secuencia:

D3L11:

DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTD Δ SYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTG
 NTTYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYPVRFALDQS
 SYDYWGQGTQVTVSS (SEC ID NO: 89)

Se generaron los siguientes constructos de fusión para probar si la inserción de una segunda molécula de anticuerpo en la región 3 del marco de un primer anticuerpo donde los

anticuerpos se unían al mismo antígeno diana daría como resultado una mayor afinidad por el antígeno que cualquiera de los anticuerpos individuales.

Cadena ligera anti-lisozima HyHEL5 con anti-lisozima VHH D3L11 (negrita) insertada en el marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:

5 DIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPVRFSGSGSGSGGGGS**DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTD****SIEYMTWFR**
QAPGKAREGVAALY**THTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSED**
TAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG**STS**
10 YSLTISSMETEDAATYYCQQWGRNPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 90)

Cadena ligera anti-lisozima HyHEL5 con anti-IL-6 VHH15 (negrita) insertado en el marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:

15 DIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG
VPVRFSGSGSGSGGGGGS**QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVAASGYTGCTYDMR**
WYRQAPGKEREFVSGIDSDGRATYADSVKGRFTISQSNAKIAVYLQMDSLKLED
TAMYYCNLQCLRYPGEYYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG**STSYSLTISSM**
20 ETEDAATYYCQQWGRNPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 91)

Cadena ligera CA645 con anti-lisozima VHH D3L11 (negrita) insertada en el marco 3, enlazadores Gly-Ser subrayados:

25 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSG
VPSRFSGSGSGSGGGGGS**DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTD****SIEYMTWFR**
QAPGKAREGVAALY**THTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSED**
TAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG**STD**
30 FTLTISSLQPEDFATYYCGGYSISDTTFGGGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 92)

En las Figuras 15 a 17 se muestran las trazas de SPR de la serie de diluciones realizadas para cada uno de los constructos cuando se prueba la unión a lisozima. A partir del análisis posterior, utilizando los métodos descritos anteriormente, la siguiente tabla revela la afinidad de unión por lisozima calculada para cada constructo:

5

Tabla 2 - Afinidades de unión para constructos de anticuerpos

Constructo	Especificidad de Fab	Especificidad de VHH	Afinidad de unión por lisozima (K_D)
Anticuerpo: HyHEL5 Fab Inserción del marco 3: VHH D3L11	lisozima	lisozima	$2.6 \times 10^{-11} \text{ M}$
Anticuerpo: HyHEL5 Fab Inserción del marco 3: VHH15	lisozima	IL-6	$3.1 \times 10^{-10} \text{ M}$
Anticuerpo: CA645 Fab Inserción del marco 3: VHH D3L11	Albúmina sérica humana	lisozima	$4.8 \times 10^{-10} \text{ M}$

Como se observa claramente a partir de los resultados anteriores, la afinidad de unión por lisozima aumenta (es decir, se observa una disminución en la K_D) para el constructo donde el Fab y el inserto VHH se unen ambos a la lisozima. La Figura 18 ilustra cómo puede suceder esto a nivel molecular. Esto también plantea la hipótesis de que la longitud del enlazador puede ser importante para permitir interacciones multivalentes en la misma molécula diana en tales anticuerpos.

15 EJEMPLO 12 - Fab CA645 con polipéptido de inserción IL-15 utilizando enlazadores bovinos

Se generaron variantes en la proteína CA645/IL-15_{Fwk3} descrita en el Ejemplo 1, donde los enlazadores se cambiaron a otros tipos de enlazadores que incluyen enlazadores bovinos, y se ensayaron sus efectos sobre la unión. Además del constructo de cadena pesada original (SEC ID NO: 54), se generaron más constructos como se muestra a continuación:

Cadena pesada de CA645 Fab con IL-15 humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3 con enlazador largo bovino (subrayado)

EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
25 FYATWAKGRFTISRDNSTSVHQETKKYQSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTES

**DVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE
CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINSYTYNYEWHVDVKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN**
5 HKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 93)

*Cadena pesada de CA645 Fab con IL-15 humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3
con enlazador corto bovino (subrayado)*

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
10 FYATWAKGRFTISRDNSETKKYQSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS
**CKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELE
EKNIKEFLQSFVHIVQMFINSYTYNYEKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYS
TAPYFDLWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**
15 KVEPKSC (SEC ID NO: 94)

*Cadena pesada de CA645 Fab con IL-15 humana (negrita y cursiva) insertada en el marco 3
con enlazador 2xG₄S (subrayado)*

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
20 FYATWAKGRFTISRDNSGGGSGGGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD
**VHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKE
EELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINGGGGSGGGGSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP**
25 SNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 95)

La Figura 19 muestra el análisis de unión de Biacore de los constructos CA645/IL-15_{Fwk3}
anteriores cuando se probaron con IL-2-R β 100 nM, y se compararon con el constructo en el
Ejemplo 1 (enlazador original) y el CA645 Fab de tipo silvestre, que no tiene inserto IL -15.
30 Se observó que todos los constructos probados mostraron una unión satisfactoria.

EJEMPLO 13 - Fragmento Fab CA645 con un dsscFv insertado en el marco 3

Diseño de genes

Se generaron y expresaron dos anticuerpos de la invención de acuerdo con los métodos anteriores para insertar un CA497 dsscFv anti-IL17A (vHvL o vLvH) en la región 3 del marco del fragmento CA645 Fab (anticuerpo de andamiaje), como se muestra a continuación. Los anticuerpos resultantes pueden denominarse CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL) o

5 CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH) respectivamente. El CA497 dsscFv y el CA645 Fab se generaron como controles.

Los genes que codifican las regiones V de cadena ligera y pesada, incluidas las variantes con una inserción de marco 3, se diseñaron y construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizada (ATUM). Los genes de la región V de la cadena ligera (ej., que codifica el

10 dominio VL de CA645 de la SEC ID NO: 2) se clonaron en vectores de expresión que contenían ADN que codificaba la región Ck humana (alotipo Km3). Los genes de la región V de la cadena pesada se clonaron en vectores de expresión que contenían ADN que codificaba la región CH1 de IgG1.

15 *CA497 dsscFv (vHvL)*

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGVIFSDYYMAWVRQAPGKCLEWVASINFNAD
ISYYRESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDANRQNYDWFAYW
GQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCKASESVSSSM
YSYMHWYQQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY
20 CQQSWTAPRTFGCGTKVEIK (SEC ID NO: 127)

CA497 dsscFv (vLvH)

AIQLTQSPSSLSASVGDRV TITCKASESVSSSMYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYRASN
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSWTAPRTFGCGTKVEIKGGGG
25 SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGVIFSDYYMAWVRQAPGKC
LEWVASINFNADISYYRESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDAN
RQNYDWFAYWGQGT LVT VSS (SEC ID NO: 128)

Cadena pesada CA645 Fab con CA497 dsscFv (vHvL) (negrita y cursiva) insertado en el

30 *marco 3, enlazadores subrayados*

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGVIFS
DYYMAWVRQAPGKCLEWVASINFNADISYYRESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLK
TEDTAVYYCTTDANRQNYDWFAYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS

**PSSLSASVGDRVTITCKASESVSSSMYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSWTAPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSK**
NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
5 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 129)

Cadena pesada CA645 Fab con CA497 dsscFv (vLvH) (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlaces subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
10 FYATWAKGRFTISRDNSSGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASESVSSS
MYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
YCQQSWTAPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRL
SCAASGVIFSDYYMAWVRQAPGKCLEWVASINFNADISYYRESVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDANRQNYDWFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSKN
15 TVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 130)

Expresión celular transitoria

20 Los fragmentos Fab modificados se expresaron transitoriamente en bien sea células HEK-293 usando el kit de transfección ExpiFectamine 293 (Life Technologies, de acuerdo con las instrucciones del fabricante) o células CHO-S XE, una línea celular derivada de CHO-K1 (Cain K, *A CHO cell line engineered to express XBP1 and ERO1-La has increased levels of transient protein expression. Biotechnology Progress* 2013; 29: 697-706), utilizando el kit de
25 transfección ExpiFectamine CHO (Life Technologies, según las instrucciones del fabricante). Se usaron células HEK-293 para expresión a pequeña escala (2 ml) para preparar constructos de anticuerpos para análisis SPR directo. Se utilizaron células CHO-S XE para la expresión a gran escala (200 ml) para preparar constructos de anticuerpos para purificación antes de la caracterización adicional.

30

Purificación

Se utilizó cromatografía de afinidad para purificar fragmentos Fab de sobrenadantes de cultivo. Los sobrenadantes que contenían los anticuerpos se pasaron a través de una columna HiTrap Protein G (GE Healthcare). Después de una etapa de lavado con solución salina

tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4, el material unido se eluyó con un gradiente de PBS pH 7.4 frente a un porcentaje creciente en volumen de tampón de citrato fosfato 0.1 M pH 2.6. El eluato se neutralizó con Tris-HCl 2 M (pH 8). Las fracciones se reunieron, se cuantificaron por absorbancia a 280 nm y se concentraron utilizando filtros centrífugos Amicon Ultra (Merck Millipore). Para aislar las fracciones monoméricas de los constructos, se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna HiLoad 16/60, Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con PBS pH 7.4. Las fracciones que contienen Fab monomérico se combinaron, cuantificaron, concentraron y almacenaron a 4 °C.

10 UPLC (cromatografía líquida de ultra alto rendimiento):

Se inyectaron 2 µg de muestra en una columna SEC BEH200, se preequilibró en PBS, pH 7.4 y se corrió durante 10 minutos. La intensidad de la fluorescencia se registró frente al tiempo de elución y las áreas de los picos elegidos manualmente en el software EMpower.

Se obtuvieron y analizaron los perfiles de elución de UPLC. Aparecieron picos > 98% monoméricos (99.42% para CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH), 99.51% para CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL)). Los controles CA497 dsscFv y CA645 Fab mostraron respectivamente 99.99% y 98.43% de formas multiméricas (datos no mostrados). Por consiguiente, las proteínas purificadas eran homogéneas y carecían de formas o agregados multiméricos.

20

Estabilidad molecular

La estabilidad molecular se midió mediante análisis de temperatura de fusión (T_m) (medida de desplegamiento) mediante el método de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas se adquirieron en un MicroCal VP DSC (Malvern Panalytical) automatizado de 0 a 100 °C, utilizando una tasa de paso de 1 °C/min, con un tiempo de barrido de preincubación de 15 minutos, un período de filtrado de 5 segundos y la retroalimentación en pasivo. Los datos se restaron en tampón antes de una sustracción manual del momento basal y una corrección de la concentración. Los termogramas se ajustaron a un modelo sin 2 estados en Origin7.0.

30 Los resultados se muestran en la figura 20 (curvas DSC; eje vertical: (C_p) calor específico; eje horizontal: temperatura en grados C (°C)) y en la tabla 3 a continuación. CA497 dsscFv y CA645 Fab mostraron transiciones sencillas de 58.40 °C y 83.57 °C respectivamente. Cuando

se combina en el formato dsscFv insertado en Fab-Fwk3, el CA497 dsscFv T_m es casi idéntico (diferencia de 2-3 °C) y el CA645 Fab tiene una variación de T_m de aproximadamente 4-5 °C. Por consiguiente, el emparejamiento de CA497 dsscFv y CA645 Fab en este formato de anticuerpo según la invención no afecta significativamente a la

5 estabilidad conformacional de ninguno de los dominios.

Tabla 3 -Temperaturas de transición de desplegado

Muestra	T_m1 (°C)	T_m2 (°C)
CA645 Fab	83.57	
CA497 dsscFv	58.40	
Cadena pesada CA645 Fab con CA497 dsscFv (vLvH) insertado en Fwk3	55.59	78.64
CA645 Fab cadena pesada con CA497 dsscFv (vHvL) insertado en Fwk3	55.41	78.73

10 Ensayo de neutralización

Se probó la potencia del anticuerpo CA497 IgG4, CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL) y CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH) contra IL-17A recombinante humana en células Hela, en presencia o en ausencia de HSA. Las células Hela se obtuvieron del banco de células en ATCC (ATCC CCL-2). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal de ternero al 10%, penicilina, gentamicina y glutamina. Se sembraron 1x10⁴ células en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. Las células se incubaron durante la noche y se lavaron una vez en tampón de ensayo. Se incubó IL-17A humana (25 ng ml⁻¹) en presencia de una concentración fija de TNF - α , humano y esta mezcla se preincubó con el anticuerpo

15 ensayado. A continuación, se agregaron las citocinas y el anticuerpo a las células Hela para estimular las células que se incubaron durante la noche. En la línea celular Hela, IL-17A se sinergiza con TNF-alfa para inducir la producción de IL-6 que puede cuantificarse, ej., por ELISA. La producción de IL-6 en el sobrenadante del cultivo celular es proporcional a la cantidad de IL-17A añadida a las células. Los niveles de IL-6 humana se midieron mediante

20

ELISA y se cuantificaron mediante la comparación con concentraciones estándar conocidas de IL-6 humana. En este ensayo, la inhibición de la secreción de IL-6 se correlaciona con la inhibición de IL-17A.

- 5 Las curvas de inhibición se muestran en la Figura 21 (eje horizontal: concentración de anticuerpo (inhibidor) en ng/ml, eje vertical: inhibición de la secreción de IL-6 (%)) e indican que el anticuerpo precursor CA497 IgG4 y ambos constructos de fusión de anticuerpos neutralizan potencialmente la IL-17A recombinante humana. Además, los resultados indican que el dsscFv anti-IL-17 retuvo la funcionalidad cuando se insertó en la región Fwk3 del Fab
- 10 anti-HSA. Los valores de CE₅₀ calculados a partir de estos experimentos (tabla 4 a continuación) indicaron que el anticuerpo CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH) y CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL) dieron una CE₅₀ de 10.5 ng/ml y 10.6 ng/ml respectivamente contra IL-17A humana recombinante (25 ng.ml⁻¹) y que la potencia de neutralización no se vio afectada por la presencia de HSA (CE₅₀ de 10.8 y 8.7 ng/ml
- 15 respectivamente, en presencia de HSA). Además, los constructos CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv tenían una potencia de neutralización comparable a la del anticuerpo precursor IgG4 CA497.

Tabla 4 - Valores de CE₅₀ para la neutralización de IL-17A en presencia o ausencia de HSA

	HSA (2.5%)	IL-17A EC ₅₀ (ng/ml)
CA497 IgG4	-	8.1
CA497 IgG4	+	7.6
CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH)	-	10.5
CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vLvH)	+	10.8
CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL)	-	10.6
CA645 Fab-Fwk3 CA497 dsscFv (vHvL)	+	8.7

EJEMPLO 14 - IgG CA645 completo con un dsscFv insertado en el marco 3

Se generó y expresó una proteína de fusión de acuerdo con los métodos anteriores para insertar CA497 dsscFv (vH-vL) o CA497 dsscFv (vL-vH) en la región 3 del marco del constructo CA645 IgG4P, como se muestra a continuación. Las proteínas de fusión de anticuerpos resultantes pueden denominarse CA645 IgG4P Fwk3-CA497 dsscFv (vHvL) y CA645 IgG4P Fwk3-CA497 dsscFv (vLvH).

Diseño de genes

Los genes que codifican las regiones V de cadena ligera y pesada, incluidas las variantes con una inserción de marco 3, se diseñaron y construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizada (ATUM).

Los genes de la región V de la cadena ligera (ej., que codifica el dominio VL de CA645 de la SEC ID NO: 2) se clonaron en vectores de expresión que contenían ADN que codificaba la región C κ humana (alotipo Km3). Los genes de la región V de la cadena pesada se clonaron en vectores de expresión que contenían ADN que codificaba regiones constantes de IgG4P para el anticuerpo de longitud completa.

Cadena pesada de CA645 IgG4P con CA497 dsscFv (vHvL) (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlaces subrayados:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDN SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGVIFS
DYYMAWVRQAPGKCLEWVASINFNADISYYRESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLK
TEDTAVYYCTTDANRQNYDWFAYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS
PSSLSASVGDRVTITCKASESVSSSMYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSR
FSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSWTAPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSK
NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGT LVT VSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID NO: 131)

Cadena pesada de CA645 IgG4P con CA497 dsscFv (vLvH) (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlaces subrayados:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWASGTT
FYATWAKGRFTISRDNSGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVITCKASESVSS
MYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATY
5 SCAASGVIFSDYYMAWVRQAPGKCLEWVASINFNADISYYRESVKGRFTISRDDSKNT
LYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDANRQNYDWFAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSKN
TVYLQMNSLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPYFDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
10 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID NO: 132)

15 **Expresión celular transitoria**

Los anticuerpos modificados se expresaron transitoriamente en células HEK-293 usando el kit de transfección ExpiFectamine 293 (Life Technologies, de acuerdo con las instrucciones del fabricante) o células CHO-S XE, una línea celular derivada de CHO-K1, usando el kit de transfección ExpiFectamine CHO (Life Technologies, según las instrucciones del fabricante).

20 Se usaron células HEK-293 para expresión a pequeña escala (2 ml) para preparar constructos de anticuerpos para análisis SPR directo. Se utilizaron células CHO-S XE para la expresión a gran escala (200 ml) para preparar constructos de anticuerpos para purificación antes de la caracterización adicional.

25 **Purificación**

Se utilizó cromatografía de afinidad para purificar IgG de los sobrenadantes de cultivo. Los sobrenadantes que contenían IgG se pasaron por una columna MabSelect SuRe (GE Healthcare). Después de una etapa de lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4, el material unido se eluyó con un gradiente de PBS pH 7.4 frente a un porcentaje creciente en volumen de tampón de citrato fosfato 0.1 M pH 2.6. El eluato se neutralizó con Tris-HCl 2 M (pH 8). Las fracciones se reunieron, se cuantificaron por absorbancia a 280 nm y se concentraron utilizando filtros centrífugos Amicon Ultra (Merck Millipore). Para aislar las fracciones monoméricas de los constructos basados en IgG, se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna HiLoad 16/60, Superdex

200 (GE Healthcare) equilibrada con PBS pH 7.4. Las fracciones que contienen los constructos IgG monoméricos se combinaron, cuantificaron, concentraron y almacenaron a 4 °C.

5 Unión simultánea a IL-17 y HSA

Para probar la unión simultánea de IL-17A y HSA a CA645 IgG4P Fwk3-CA497 dsscFv (vHvL), este último se inmovilizó en un chip de Biacore en lugar de F(ab)₂ de cabra policlonal en el mismo procedimiento anterior. Se seleccionaron tres concentraciones de IL-17A y HSA para dar niveles bajos, medios y altos de unión al anticuerpo inmovilizado, específicamente estos correspondían a relaciones estequiométricas de ligando a anticuerpo en los intervalos de 0.15 a 0.3, 0.4 a 0.6 y 0.65 a 0.75. respectivamente. En el caso de IL-17A, las concentraciones fueron 4, 20 y 100 nM y las concentraciones de HSA fueron 40, 200 y 1000 nM respectivamente. Las concentraciones bajas, medias y altas anteriores se probaron mediante SPR como se describió previamente en ciclos individuales bien sea como ligandos separados o como mezclas de IL17A/HSA y los puntos de informe se corrigieron mediante la sustracción de los ciclos de control de tampón. Los resultados se muestran en la Figura 22 y muestran que el CA645 IgG4P Fwk3-CA497 dsscFv (vHvL) se une tanto a IL-17A como a HSA, de una manera dependiente de concentración. La Figura 22 muestra además que en presencia de ambos pares de unión, la señal es aditiva, lo que muestra que la unión a IL-17A y HSA puede ocurrir simultáneamente.

EJEMPLO 15- Anticuerpos de la invención que se unen tanto a CD3 como a CD28

Diseño de genes

Los anticuerpos se generaron y expresaron de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para insertar anti-CD3 dsscFv (vH-vL) en la región 3 del marco del anticuerpo de andamio anti-CD3 o anti-CD28 (IgG4P o fragmento Fab) como se muestra a continuación en la Tabla 5. Los constructos de anticuerpos resultantes de acuerdo con la invención pueden denominarse anti-CD28 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv (LC de SEC ID NO: 136, HC de SEC ID NO: 139), anti-CD3 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv (LC de SEC ID NO: 133, HC de SEC ID NO: 140), anti-CD28 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv (LC de SEC ID NO: 136, HC de SEC ID NO: 141), anti-CD3 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv (LC de SEC ID NO: 133, HC de SEC ID NO: 142).

Tabla 5 - Constructos de anticuerpos

Anticuerpo de andamiaje	Especificidad de antígeno (dominio V del andamiaje)	Especificidad de antígeno (dsscFv insertado en Fwk3)	Secuencia
Fab	CD3	Ninguno	Cadena ligera de SEC ID NO: 133 Cadena pesada de SEC ID NO: 134
Fab	CD28	Ninguno	Cadena ligera de SEC ID NO: 136 Cadena pesada de SEC ID NO: 137
Fab	CD28	CD3	Cadena ligera de SEC ID NO: 136 Cadena pesada de SEC ID NO: 139
Fab	CD3	CD3	Cadena ligera de SEC ID NO: 133 Cadena pesada de SEC ID NO: 140
IgG4P	CD3	Ninguno	Cadena ligera de SEC ID NO: 133 Cadena pesada de SEC ID NO: 135
IgG4P	CD28	Ninguno	Cadena ligera de SEC ID NO: 136 Cadena pesada de SEC ID NO: 138
IgG4P	CD28	CD3	Cadena ligera de SEC ID NO: 136 Cadena pesada de SEC ID NO: 141
IgG4P	CD3	CD3	Cadena ligera de SEC ID NO: 133 Cadena pesada de SEC ID NO: 142

Cadena ligera anti-CD3, muromonab (OKT3 humanizado) (dominio variable subrayado; CDR en negrita y cursiva):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKLLIYDTSKLASGVP
SRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 133)

- 5 *Fab de cadena pesada anti-CD3, CH1 de IgG1, muromonab (OKT3 humanizado) (dominio variable subrayado; CDR en negrita y cursiva):*

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSL RPEDTG VYFCARYYDDHYCLDYWGQG
TPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 10 TFFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 134)

IgG4P de cadena pesada anti-CD3, muromonab (OKT3 humanizado) (dominio variable subrayado; CDR en negrita y cursiva):

- 15 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSL RPEDTG VYFCARYYDDHYCLDYWGQG
TPVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPC
 PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
 20 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
 FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEC ID NO: 135)

Cadena ligera anti-CD28, theralizumab (dominio variable subrayado; CDR en negrita y cursiva):

- 25 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID NO: 136)

- 30 *Fab de cadena pesada anti-CD28, CH1 de IgG1, theralizumab (dominio variable subrayado; CDR en negrita y cursiva):*

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY^YIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNV
NTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQ
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC
5 ID NO: 137)

*IgG4P de cadena pesada anti-CD28, theralizumab (dominio variable subrayado; CDR en
negrita y cursiva):*

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY^YIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNV
NTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQ
10 GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
15 DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLK (SEC ID
NO: 138)

*Cadena pesada anti-CD28 Fab con anti-CD3 dsscFv (vHvL) (negrita y cursiva) insertado en
el marco 3, enlazadores subrayados:*

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY^YIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNV
20 NTNYNEKFKDRATLTVDTSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGY
TFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNSKNTAFLQM
DSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKLLIYDTSKLASGVP
SRFSGSGSGTDYTFTISSLPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGS
25 ISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 139)

*Cadena pesada anti-CD3 Fab con anti-CD3 dsscFv (vHvL) (negrita y cursiva) insertado en
el marco 3, enlazadores subrayados:*

30 QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDRFTISRDNSGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGY

TFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQM
DSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKLLIYDTSKLASGVP
SRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGS
5 KNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEC ID NO: 140)

Cadena pesada Anti-CD28 IgG4P con anti-CD3 dsscFv (vHvL) (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlazadores subrayados:

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNV
NTNNEKFKDRATLTVDTSGGGGSGGGGS**QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGY**
TFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQM
DSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKLLIYDTSKLASGVP
15 **SRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGS**
ISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
20 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEC ID NO: 141)

Cadena pesada anti-CD3 IgG4P con anti-CD3 dsscFv (vHvL) (negrita y cursiva) insertado en el marco 3, enlazadores subrayados:

25 QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDRFTISRDNSGGGSGGGGS**QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGY**
TFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQM
DSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKLLIYDTSKLASGVP
30 **SRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGS**
KNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEC ID NO: 142)

UPLC (cromatografía líquida de ultra alto rendimiento):

Se inyectaron 2 µg de muestra en una columna SEC BEH200, se preequilibró en PBS, pH 7.4 y se corrió durante 10 minutos. La intensidad de la fluorescencia se registró frente al tiempo de elución y las áreas de los picos elegidos manualmente en el software EMpower.

- 10 Se obtuvieron y analizaron los perfiles de elución de UPLC. Aparecieron picos > 98% monoméricos (anti-CD3 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv: 99.02%, anti-CD3 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv: 99.79%, anti-CD28 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv: 99.48%) con la excepción de un hombro de menor peso molecular del 12.12% en anti-CD28 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv. No hubo evidencia de multimerización de ningún formato.

15

Estabilidad molecular

La estabilidad molecular se midió mediante análisis de temperatura de fusión (T_m) (medida de desplegamiento) mediante el método de calorimetría diferencial de barrido (DSC) como se describió anteriormente. Las curvas DSC se muestran en la Figura 23 (A) y (B), y los valores de T_m se presentan en las Tablas 6 y 7 a continuación.

20

Tabla 6- Fab-Fwk3-dsscFv

Anticuerpo de la invención	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)
Anti-CD28 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv	70.16	74.73
Anti-CD3 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv	70.04	

Las curvas de DSC para anti-CD3 Fab Fwk3-anti-CD3 dsscFv mostraron una única transición de despliegue a 70.04 °C. Por el contrario, el despliegue del constructo que contiene anti-CD28 no puede describirse con precisión mediante una única transición, pero se ajusta mejor a un modelo de dos transiciones sin 2 estados; el más bajo de los cuales se puede atribuir al componente dsscFv. Los resultados muestran notablemente que la inserción del Fab en la

25

posición del marco 3 dio como resultado constructos estables, ya que los valores de 65 °C a 75 °C están en línea con los de una IgG típica.

Tabla 7- IgG4P-Fwk3-dsscFv

Anticuerpo de la invención	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
Anti-CD28 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv	68.97	73,28
Anti-CD3 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv	68.55	

5

Las curvas de DSC para anti-CD3 IgG4P Fwk3-anti-CD3 dsscFv mostraron una única transición de despliegue a 68.55°C. Por el contrario, el despliegue de los constructos que contiene anti-CD28 no puede describirse con precisión mediante una única transición, pero se ajusta mejor a un modelo de dos transiciones sin 2 estados; el más bajo de los cuales se puede atribuir al componente dsscFv. Los resultados muestran notablemente que la inserción de la IgG en la posición del marco 3 dio como resultado constructos estables, ya que los valores de Tm de 65 °C - 75 °C son típicos de moléculas similares a IgG.

10

Evaluación de constructos de Fab e IgG4P con inserciones de marco 3 en un ensayo de PBMC funcional humano

15

Se ensayó la capacidad de los constructos para estimular la activación de células T en un cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de acuerdo con el método que se describe a continuación.

Reactivos

20

Los anticuerpos utilizados para detectar células T CD4 y CD8, distinguir células vivas y muertas y medir el marcador de activación CD69 se obtuvieron de BD Biosciences (se acoplaron el anticuerpo anti-CD4, anti-CD8, anticuerpo anti-CD69 y el anticuerpo que distingue células vivas/muertas respectivamente a los fluoróforos FITC, PE, BV421 y Near Infrared. Todo el cultivo celular se realizó en RPMI1640 (Thermo) más suero AB humano inactivado por calor al 5% (Sigma) y glutamina 2 mM (Thermo). Toda la tinción por citometría de flujo se realizó usando un tampón de citometría de flujo estándar que comprende PBS de Dulbecco (Thermo) más albúmina sérica de bovino al 1% (Sigma),

25

EDTA 2 mM (Sigma) y azida de sodio al 0.1% (Sigma). OKT3 humano (Ebioscience) y Transact de células T (Miltenyi) una suspensión coloidal de anti-CD3 y CD28. Todos los datos de citometría de flujo se adquirieron utilizando un iQUEplus (Sartorius). Las células T se identificaron utilizando el software Forecyt (Sartorius) y las métricas de datos se importaron a GraphPad Prism 7 (GraphPad) para las transformaciones de datos y la representación gráfica.

Método:

Los constructos de anticuerpos de la tabla 5 se diluyeron desde 25 µg/ml en ocho etapas de dilución de 1 a 5. En el paso posterior al análisis, todos estos valores se convirtieron en concentraciones nM para permitir comparaciones iguales de todos los constructos. En placas de cultivo de tejidos con fondo en U de 96 pocillos se mezclaron 1.5×10^5 PBMC (de dos donantes diferentes anonimizados como donantes 1 y 2) con los anticuerpos diluidos. OKT3 (5 µg/ml), Transact (CD3/CD28 diluido 1 en 100) y los medios solos fueron controles de referencia para el experimento. Después de mezclar, las placas se incubaron a 37 grados Celsius durante 24 horas. Después de este tiempo, las placas se enfriaron en hielo y se centrifugaron (todas las agitaciones posteriores fueron a 500g durante 5 minutos a 4 grados Celsius) y se eliminó el sobrenadante de cada pocillo. Las placas se lavaron de nuevo, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 20 µl de un cóctel de anticuerpos a cada pocillo (todos los anticuerpos se diluyeron 1:20 en tampón de citometría de flujo y se agregó 1 µl de colorante vivo/muerto por 1 ml de cóctel). Las placas se dejaron en hielo en la oscuridad durante 1 hora. Después de este tiempo, las placas se lavaron dos veces más y se eliminó el sobrenadante de todos los pocillos. Las placas se resuspendieron finalmente en 20 µl de tampón de citometría de flujo y se adquirieron al menos 10.000 células por pocillo.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 24 (A-D; el eje vertical representa el nivel de expresión de CD69 (MFI) y el eje horizontal representa la concentración del constructo de anticuerpos en nM). El experimento se consideró exitoso ya que el control positivo (OKT3) indujo el marcador de activación temprana, CD69, tanto en células T CD4 como CD8. El nivel mínimo de activación (solamente células) fue determinado por el control de sólo células. Como puede observarse en la figura 24 (A) y (B), la inducción de CD69 en células T CD4 para los constructos probados fue consistente entre donantes.

Los anticuerpos de la invención que contienen CD3 y CD28 (ya sea en formato Fab o IgG4P) fueron los activadores más potentes de las células T CD4. Como se esperaba en este ensayo, los constructos que contienen un Fc también pueden aportar actividad añadida a través de receptores Fc en otras células (no) T, en particular monocitos, que dan señales coestimuladoras potenciadas. A este respecto, el anti-CD3 IgG4P Fwk3-anti-CD3dsscFv también mostró actividad en este ensayo (al igual que el control OKT3 que es un anticuerpo total IgG anti-CD3). Estos datos demuestran que los anticuerpos de la invención que se unen tanto a CD3 como a CD28 son activadores funcionales de células T CD4 humanas en un ensayo de PBMC mixto y, como tales, son capaces de ejercer la función de un anticuerpo biespecífico.

Además, también se midió la activación de las células T CD8 en el mismo ensayo. Como se describió anteriormente, todos los controles positivos y negativos funcionaron como se esperaba. Como puede observarse en la figura 24 (C) y (D), la inducción de CD69 en células T CD8 para los constructos probados fue consistente entre donantes. Los anticuerpos de la invención que contienen CD3 y CD28 (ya sea en formato Fab o IgG4P) fueron los activadores más potentes de las células T CD8. El anti-CD3 IgG4P Fwk3 anti-CD3dsscFv también mostró actividad en este ensayo (al igual que el control OKT3, que es un anticuerpo total IgG anti-CD3). Estos datos demuestran que los anticuerpos de la invención que se unen tanto a CD3 como a CD28 son activadores funcionales de células T CD8 humanas en un ensayo de PBMC mixto y, como tales, son capaces de ejercer la función de un anticuerpo biespecífico.

Los resultados muestran que los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen la funcionalidad tanto del anticuerpo de andamiaje (ej., anti-CD28 Fab o IgG4P) como del polipéptido de inserción, es decir, el segundo anticuerpo (ej., anti-CD3 dsscFv) cuando el polipéptido de inserción está presente en la región Fwk3 del anticuerpo de andamiaje.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, comprender significa incluir.

Cuando sea técnicamente apropiado, se pueden combinar modalidades de la invención. Las modalidades se describen en este documento como que comprenden ciertas características/elementos. La divulgación también se extiende a modalidades separadas que consisten o constan esencialmente en dichas características/elementos.

Por supuesto, se entenderá que, aunque la presente invención se ha descrito a modo de ejemplo, los ejemplos no pretenden de ningún modo ser limitantes, y se pueden realizar modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones a continuación. Las características preferidas de cada modalidad de la invención son las mismas que para cada una de las otras

5 modalidades *mutatis mutandis*. Todas las publicaciones, incluidas, entre otras, las patentes y las solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva se incorporan aquí como referencia como si cada publicación individual estuviera indicada específica e individualmente para incorporarse como referencia en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende un dominio variable (V) y un polipéptido de inserción, en donde el polipéptido de inserción está dentro de la región 3 del marco del dominio V.
5
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el dominio V es un dominio VH.
3. El anticuerpo según la reivindicación 2, que además comprende un dominio VL.
- 10 4. El anticuerpo según la reivindicación 2, en donde el polipéptido de inserción está entre los residuos de aminoácidos 73 y 76 del dominio VH.
5. El anticuerpo según la reivindicación 4, en donde el polipéptido de inserción está en el dominio VH: (i) entre los residuos aminoácidos 73 y 74; (ii) entre los residuos aminoácidos
15 74 y 75; o (iii) entre los residuos aminoácidos 75 y 76.
6. El anticuerpo según la reivindicación 4 o 5, en donde uno o más residuos de aminoácidos entre 73 y 76 del dominio VH están reemplazados por el polipéptido de inserción.
20
7. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el dominio V es un dominio VL.
8. El anticuerpo según la reivindicación 7, que además comprende un dominio VH.
- 25 9. El anticuerpo según la reivindicación 7, en donde el polipéptido de inserción está entre los residuos de aminoácidos 67 y 70 del dominio VL.
10. El anticuerpo según la reivindicación 9, en donde el polipéptido de inserción está en el dominio VL: (i) entre los residuos aminoácidos 67 y 68; (ii) entre los residuos aminoácidos
30 68 y 69; o (iii) entre los residuos aminoácidos 69 y 70.
11. El anticuerpo según la reivindicación 9 o 10, en donde uno o más residuos de aminoácidos entre 67 y 70 del dominio VL están reemplazados por el polipéptido de inserción.

12. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además una secuencia enlazadora de al menos un aminoácido que une el extremo N- y/o C-terminal del polipéptido de inserción a la región 3 del marco.

5

13. El anticuerpo según la reivindicación 12, en donde la secuencia enlazadora tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más aminoácidos en el extremo N-terminal de la porción de polipéptido de inserción.

10 14. El anticuerpo según la reivindicación 12 o 13, en donde la secuencia enlazadora tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más aminoácidos en el extremo C-terminal de la porción de polipéptido de inserción.

15 15. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión del mismo.

16. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que es una IgG de longitud completa o un fragmento de unión del mismo.

20 17. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que es un Fab, Fab', F(ab')₂, VHH o scFv, en particular dsscFv.

18. El anticuerpo según la reivindicación 17, que es un Fab.

25 19. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está humanizado.

20. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho dominio V se une a la albúmina sérica humana.

30

21. El anticuerpo según la reivindicación 20, que comprende un dominio VL que comprende CDR-L1 que tiene la secuencia SEC ID NO: 3; CDR-L2 que tiene la secuencia SEC ID NO: 4; CDR-L3 que tiene la secuencia SEC ID NO: 5.

22. El anticuerpo según la reivindicación 21, que comprende un dominio VL que comprende la SEC ID NO: 2 o SEC ID NO: 102.
23. El anticuerpo según la reivindicación 22, que comprende una cadena L que
5 comprende la SEC ID NO: 1.
24. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, que comprende un dominio VH que comprende CDR-H1 que tiene la secuencia SEC ID NO: 8; CDR-H2 que tiene la secuencia SEC ID NO: 9; CDR-H3 que tiene la secuencia SEC ID NO: 10.
10
25. El anticuerpo según la reivindicación 24, que comprende un dominio VH que comprende la SEC ID NO: 7 o SEC ID NO: 103.
26. El anticuerpo según la reivindicación 25, que comprende una cadena H que
15 comprende la SEC ID NO: 6.
27. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido de inserción es una citocina.
- 20 28. Anticuerpo según la reivindicación 27, en donde la citoquina se selecciona entre IL-10, IL-15, IL-2, G-CSF, GM-CSF y EPO.
29. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde el polipéptido de inserción es un segundo anticuerpo.
25
30. El anticuerpo según la reivindicación 29, en donde el segundo anticuerpo es un scFv, en particular un dsscFv, o un dominio de anticuerpo tal como VH o VL o VHH.
31. El anticuerpo según la reivindicación 30, en donde el VHH comprende una secuencia
30 seleccionada entre las SEC ID NO: 67, 69 y 89.
32. El anticuerpo según la reivindicación 30, en donde el segundo anticuerpo se une al mismo antígeno que el dominio V.

33. El anticuerpo según la reivindicación 32, en donde el segundo anticuerpo se une a un epítoto diferente en comparación con el dominio V.
34. El anticuerpo según la reivindicación 30, en donde el segundo anticuerpo se une a un antígeno diferente del anticuerpo que comprende un dominio V.
35. El anticuerpo según la reivindicación 34, en donde el segundo anticuerpo se une a IL-17 y el anticuerpo que comprende un dominio V se une a HSA.
36. El anticuerpo según la reivindicación 34, en donde el segundo anticuerpo se une a CD3 y el anticuerpo que comprende un dominio V se une a CD28.
37. El anticuerpo según la reivindicación 34, en donde el segundo anticuerpo se une a CD28 y el anticuerpo que comprende un dominio V se une a CD3.
38. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une a su antígeno afín por dicho dominio V con una afinidad de unión que es al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%. en comparación con el anticuerpo sin el polipéptido de inserción presente.
39. El anticuerpo según la reivindicación 32 o 33, que se une a su antígeno afín con una afinidad de unión que es mayor que cuando se compara con el anticuerpo sin el segundo anticuerpo presente.
40. Una molécula de ADN aislada o un par de moléculas de ADN que codifican el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39.
41. Un vector de clonación o expresión o un par de vectores de clonación o expresión que codifican el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39.
42. Una célula hospedera que comprende un vector de clonación o expresión o un par de vectores de clonación o expresión según la reivindicación 41.

43. Un proceso para la producción de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, que comprende cultivar la célula hospedera de la reivindicación 42 y aislar el anticuerpo.
- 5 44. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 45. Un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 o una composición como se define en la reivindicación 44 para su uso en terapia.
46. Un método de terapia que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 o una composición como se define en la reivindicación 44 a un sujeto que necesita la terapia.
- 15 47. Uso de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39 para la fabricación de un medicamento.

RESUMEN

La presente invención proporciona anticuerpos que comprenden un dominio variable (V) y un polipéptido de inserción, en donde el polipéptido de inserción está dentro de la región 3 del marco del dominio V.

5