



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 051**

51 Int. Cl.:

C07K 17/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00985080 .1**

96 Fecha de presentación : **22.11.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1233987**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2002**

54

Título: **Inmovilización de moléculas de unión de antígenos de un dominio.**

30

Prioridad: **29.11.1999 EP 99309516**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2009

73

Titular/es: **BAC IP B.V.**
Huizerstraatweg 28
1411 GP Naarden, NL

72

Inventor/es: **Frenken, Leo G. J.;**
Grant, Steven Daryl;
Haft, Ten Mark R. y
Van der Logt, Cornelis, P.

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 331 051 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inmovilización de moléculas de unión de antígenos de un dominio.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la inmovilización de los dominios de unión de antígenos (VHH) de anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras o sus equivalentes funcionales en superficies sólidas con retención de actividad de unión. Más particularmente, la invención se refiere a la preparación y uso de materiales inmunoactivos que comprenden un dominio VHH, sin ninguna extensión peptídica, inmovilizados en una superficie sólida mediante interacciones covalentes.

Antecedentes de la invención

15 Los procesos dirigidos a inmovilizar proteínas en una superficie sólida son de un interés comercial considerable. La funcionalización de superficies con materiales inmunológicos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, en particular, forma la base de técnicas de inmunoadsorción tales como los procesos de purificación de afinidad que se aplican cada vez más en la recuperación o purificación de una gama de materiales comercialmente importantes.

20 Comúnmente, la fijación de proteínas a superficies sólidas, tales como medios de cromatografía, se ha realizado exponiendo la superficie a una solución de la proteína de tal manera que la proteína sea adsorbida sobre la superficie sólida a través de mecanismos de enlace no específicos. Los métodos para inmovilizar proteínas en medios de cromatografía están bien establecidos en la bibliografía, véase por ejemplo, en *Protein Immobilisation*, R.F. Taylor ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1991. Si la superficie sólida es provista por un material hidrofóbico tal como poliestireno, por ejemplo, entonces la fijación se realiza generalmente por adsorción de regiones hidrofóbicas de la proteína sobre la superficie hidrofóbica.

La adsorción sobre la superficie sólida viene normalmente acompañada de la rotura conformacional significativa con desplegamiento y desnaturalización parcial de la proteína concernida. La pérdida concomitante de actividad de la proteína devalúa la utilidad global del proceso. Comúnmente, por ejemplo, la adsorción de anticuerpos sobre una superficie hidrofóbica viene acompañada de la pérdida de en el orden de más del 95% de actividad de unión así como una menor especificidad de unión. Si hay fragmentos de anticuerpos más pequeños implicados, el grado de afinidad de enlace específico conservado tras la adsorción sobre una superficie sólida puede ser incluso inferior, como ha descrito Molina-Bolivar *et al*, *J. Biomaterials Science-Polymer Edition*, 9, 1103-1113, 1998.

35 Se han considerado alternativas o mejoras al método de adsorción de proteínas en la preparación de superficies con proteínas inmovilizadas.

Un procedimiento alternativo es usar la reticulación química de residuos en la proteína para la fijación covalente a una superficie sólida activada usando químicas de acoplamiento convencional, por ejemplo como se describe en *Bioconjugate Techniques*, G.T. Hermanson, ed. Academic Press, Inc., San Diego, CA, EEUU. Residuos de aminoácidos que incorporan grupos sulfhidrilo, tales como la cisteína, pueden unirse de manera covalente usando un reactivo biespecífico tal como succinimidil-maleimidofenilbutirato (SMPB), por ejemplo. De forma alternativa, grupos de lisina localizados en la superficie de proteínas pueden acoplarse a grupos carboxilo activados en la superficie sólida por acoplamiento de carbodiimida convencional usando 1,etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Una desventaja de este procedimiento es que los residuos de reticulación en la proteína pueden interferir en la funcionalidad de la proteína. Cuanto más pequeño sea el fragmento de anticuerpo para ser inmovilizado, mayor es la probabilidad de que la reticulación implique un residuo en, o cerca del sitio de unión del antígeno y, consecuentemente, que interfiera en la actividad de unión. Esto ha sido observado específicamente para el caso de los clásicos dominios VH aislados, en los que se encontró que la reticulación producía pérdidas sustanciales en afinidad y especificidad de unión (véase, por ejemplo, Berry *et al*, *Journal of Chromatography*, 597, 239-245 (1992), que sugiere que los clásicos dominios VH son más fácilmente inactivados que los fragmentos Fv durante la inmovilización). Como ha demostrado Spitznagel *et al*, *Bio/Technology*, 11, 825-829, (1993), además de actividades específicas reducidas, los anticuerpos inmovilizados normalmente exhiben afinidades de unión inferiores a sus homólogos solubles.

55 Suministrando el fragmento de anticuerpo con una extensión en forma de una cola peptídica o un dominio de proteína adicional, la fijación de la proteína a la superficie puede ser causada por adsorción no covalente o usando agentes de reticulación químicos convencionales en un sitio remoto del cuerpo principal de la proteína. De esta manera, es menos posible que el proceso de inmovilización mismo interfiera en la funcionalidad de la proteína.

60 También pueden emplearse los procedimientos de acoplamiento racional para controlar la orientación del fragmento de anticuerpos (Rao *et al*, *Mikrochimica Acta*, 128 (3-4), 127-143, 1998). Además, el aumento de la longitud del enlazador químico usado para fijar la molécula inmovilizada al soporte sólido puede reducir las tensiones conformacionales en la proteína, permitiendo que exista en una conformación más natural.

65 EP 0434317 (Joseph Crosfield & Sons) expone el uso de medios de purificación de afinidad mejorada empleando agentes de enlace específico pequeños, especialmente fragmentos de anticuerpos Fv. Estos opcionalmente tienen una cola hidrofóbica, con un grupo de enlace particularmente preferido siendo el epitopo myc (Munro, S., y Pelham, H.R.

(1986) Célula 46, 291-300). Tal cola está principalmente destinada a facilitar la inmovilización del agente de unión por enlace no covalente sobre una superficie hidrofóbica, aunque como el grupo myc contiene un residuo de lisina, podría también ser usado para el enlace covalente sobre superficies.

5 WO 91/08482 (Unilever) describe en el ejemplo 6 una anti-lisozima VH sin cola, inmovilizada en una fase sólida; de los resultados presentados se deduce que la actividad de enlace de los anticuerpos se ve contraria y seriamente afectada en comparación con fragmentos inmovilizados VH en una superficie sólida a través de una cola peptídica.

10 Sigue habiendo una necesidad de mejorar la capacidad para preparar superficies inmunoactivas por inmovilización de fragmentos de anticuerpos conservando su afinidad y especificidad de enlace, preferiblemente sin la necesidad de elaborarlas con secuencias de cola.

15 Una clase de anticuerpos de interés particular en relación con las aplicaciones biotecnológicas comprende los anticuerpos de cadena pesada tales como los que se encuentran en los camélidos, como el camello o la llama. Los elementos de unión de estos anticuerpos consisten en un único dominio de polipéptido, es decir la región variable del polipéptido de cadena pesada (VHH). Estos anticuerpos están naturalmente desprovistos de cadenas ligeras con el dominio variable de cadena pesada formando el sitio de unión de antígeno completo. Por el contrario, los clásicos anticuerpos (murinos, humanos, etcétera), tienen elementos de unión comprendiendo dos dominios de polipéptido (las regiones variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL)). La falta de dependencia en interacción con un dominio variable de cadena ligera para mantener la integridad estructural y funcional proporciona a estos dominios VHH una ventaja sustancial sobre otros pequeños fragmentos de anticuerpos, en cuanto a facilidad de producción y comportamiento en solución. En particular, los fragmentos VHH son los tipos preferidos de moléculas para la purificación por inmutafinidad, debido a su estabilidad inusual y su capacidad de replegarse eficazmente después de la desnaturalización completa, que frecuentemente ocurre durante la elución del antígeno.

25 M. Arbabi-Ghahroudi *et al*, FEBS Letters, vol 414 no 3, 15 Septiembre 1997, páginas 521-526 expone la selección e identificación de fragmentos de anticuerpos de dominio único de anticuerpos de cadena pesada de camello (dominio VHH).

30 Los procedimientos para obtener inmunoglobulinas de cadena pesada de camélidos, o sus fragmentos (funcionalizados), han sido descritos en WO 94/04678 (Casterman *et al*) y WO 94/25591 (Frenken *et al*). Los fragmentos VHH pueden ser producidos a través de tecnología de ADN recombinante en un número de huéspedes microbianos, (bacterianos, levadura, molde), como se describe en WO 94/29457 (Frenken *et al*). De forma alternativa, los dominios de unión pueden ser obtenidos por modificación de los fragmentos VH de anticuerpos tradicionales por un procedimiento denominado "camelización", descrito por Davies *et al*, Bio/Technology, 13, 475-479 (1995). Por este medio el fragmento VH clásico es mutado, por sustitución de un número de aminoácidos presentes en la interfaz VH/LV, en un fragmento tipo VHH, por lo cual se mantienen sus propiedades de unión.

40 La inmovilización de un fragmento VHH con una cola His en una capa de dextrano carboxilado usando química de acoplamiento EDC/NHS está descrita por Muyldermans *et al*, EMBO Journal, 17 (13), p3512-3520, 1998. La inmovilización mediada con cola de polipéptido de fragmentos VHH en superficies sólidas también es propuesta en WO 99/23221 (Unilever).

45 **Resumen de la invención**

La invención describe la inmovilización de fragmentos de unión del antígeno de único dominio de anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras (VHH), o dominios de proteína funcionalmente equivalente a ellos, sobre una superficie sólida a través de reticulación covalente mientras se sigue conservando la actividad biológica suficiente para permitir que los fragmentos funcionen (por ej. como en una matriz de purificación de afinidad). Los propios fragmentos son inmovilizados directamente en la superficie sólida; éstos son desprovistos de cualquier grupo polipéptido añadido a través del cual la inmovilización podría ser de lo contrario mediada. Los fragmentos VHH descritos son normalmente inferiores a 20 kDa en peso molecular y contienen sólo la secuencia de aminoácidos necesaria para formar un fragmento VHH funcional completo o una porción del mismo (fragmento truncado).

La presente invención puede ser mejor entendida con referencia a la descripción siguiente leída con los dibujos anexos donde:

60 Figura 1 muestra un análisis por SDS-PAGE del acoplamiento de fragmentos de anticuerpos VHH a CnBr-sepharosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas fueron teñidas usando azul brillante de Coomassie. El set marcador de peso molecular fue de GibcoBRL (BenchMark Lot. N°.: 1080925).

65 Figura 2 muestra cromatogramas obtenidos durante la purificación de IgG de ratón de suero por cromatografía de inmutafinidad usando la versión marcada inmovilizada (codificada 1A) y la versión no marcada (codificada 3) de VHH#1.

ES 2 331 051 T3

Figura 3 representa muestras de purificación de IgG de ratón de suero por cromatografía de inmunoafinidad, analizadas en un gel SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie.

Panel izquierdo: purificación usando VHH#1 inmovilizado no marcado. (línea 1: marcadores de peso molecular; línea 2: suero de ratón; línea 3: flujo (fracción 3 - véase figura 2); línea 4: elución (fracción 10 - véase figura 2).

Panel derecho: purificación usando VHH#1 inmovilizado marcado. (línea 1: marcadores de peso molecular; línea 2: suero de ratón; línea 3: flujo (fracción 3); línea 4: elución (fracción 10).

Marcadores de peso molecular: marcador GibcoBRL BenchMark (Lot. No.: 1080925).

Figura 4 representa muestras de purificación de IgG de suero de ratón analizado por transferencia Western.

Línea 1,5,9: marcadores

Líneas 2-4: purificación usando VHH#1 inmovilizado no marcado (línea 2: suero de ratón; línea 3: flujo (fracción 3 - véase figura 2); línea 4: elución (fracción 10 - véase figura 2).

Líneas 6-8: purificación usando VHH#1 inmovilizado marcado (línea 6: suero de ratón; línea 7: flujo (fracción 3 - véase figura 2); línea 8: elución (fracción 10 - véase figura 2)

Marcadores de peso molecular: Marcador GibcoBRL BenchMark (Lot. No.: 1080925).

Figura 5 muestra un cromatograma obtenido durante la purificación de hierba AFP de caldo por cromatografía de inmunoafinidad usando la versión de VHH#2 inmovilizado no marcado.

30 Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que los fragmentos VHH clonados pueden ser fijados a una superficie de matriz de fase sólida (y además conservar actividad suficiente para funcionar como ligando de afinidad de una matriz de purificación) en ausencia de cualquier grupo polipéptido añadido tal como colas peptídicas o dominios de proteína extras (dominio pesado no variable).

Esto contrasta sorprendentemente con la situación con los fragmentos VH clásicos donde, para conservar actividad de unión, se descubrió que era necesario proveer al fragmento con una cola de polipéptido a través de la cual se podía mediar la inmovilización, de manera que se produzca la fijación a la superficie sólida en una ubicación remota del sitio de unión del antígeno. Las razones convencionales de ello es que parece ser que todos los residuos en tal dominio de unión pequeño son importantes ya sea para el enlace del antígeno o para asegurar la integridad estructural y en consecuencia que la reticulación en cualquier punto de la molécula tienda a producir su inactivación. Suponiendo que los dominios VHH y VH son de tamaño similar, generalmente sería de esperar que ambos sean sometidos a perturbaciones de inactivación similares tras la inmovilización en una superficie.

Los presentes inventores han mostrado claramente que la inmovilización de dominios VHH, desprovistos de cualquier extensión peptídica, en una superficie a través de reticulación covalente no destruye su capacidad de enlazar antígenos con alta afinidad y selectividad. Además, se ha demostrado que la provisión de una extensión de péptido reticulable no mejora ni la eficiencia de la reacción de reticulación ni la capacidad de enlace del antígeno o selectividad de los dominios VHH unidos.

La capacidad de fijar fragmentos de anticuerpos funcionales directamente a una superficie, mejor que a través de una secuencia marcadora fundida, es extremadamente ventajosa porque es bien conocido que las proteínas de fusión de este tipo son altamente susceptibles de proteólisis, con pérdida consecuente del anticuerpo inmovilizado de la superficie; véase por ejemplo McCafferty, J. *et al* (1990) *Nature* 348, 552-554.

Un dominio VHH es un dominio variable de cadena pesada derivado de una inmunoglobulina naturalmente desprovista de cadenas ligeras, tal como puede obtenerse de camélidos como se ha descrito anteriormente. La capacidad de unión y especificidad del antígeno está localizada natural y exclusivamente en el dominio variable de cadena pesada; es decir, el dominio variable de cadena pesada forma el sitio de unión del antígeno completo.

Los términos “inmunoglobulina” y “anticuerpo” son usados como sinónimos en toda esta especificación a menos que se indique lo contrario.

Una ventaja del uso de inmunoglobulinas o dominios variables de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadenas ligeras es que pueden ser fácil y convenientemente producidos económicamente a gran escala, por ejemplo, usando un huésped eucariótico inferior transformado como se describe en WO 94/25591, mencionado arriba. Además, como se indicó anteriormente, la ausencia de dependencia de una cadena ligera para asegurar la integridad estructural

ES 2 331 051 T3

y funcional hace los dominios VHH aislados más estables y más fáciles de manejar que otros pequeños fragmentos de anticuerpos tales como los dominios VH clásicos. Esto es especialmente ventajoso para la preparación de matrices de afinidad reutilizables.

5 Por funcionalmente equivalente se entiende cualquier proteína que tenga las mismas o similares propiedades de unión de antígeno localizadas en un único dominio de unión. Se apreciará que también se pueden usar proteínas modificadas para que puedan funcionar como dominios de unión de la misma manera que los dominios variables de inmunoglobulina de cadena pesada de camélidos (véase Davies *et al*, Bio Technology, 13, 475-479, (1995)) de manera adecuada según la invención.

10 Según una forma de realización de la invención, el dominio VHH o proteína funcionalmente equivalente es fijado a una superficie sólida por reticulación covalente usando químicas de acoplamiento convencional.

15 Se apreciará que como el dominio VHH o funcionalmente equivalente es fijado a una superficie sólida por acoplamiento covalente, la superficie debe ser capaz de acoplarse de manera covalente al dominio VHH. La superficie sólida puede naturalmente comprender residuos reticulables adecuados para la fijación covalente o puede ser revestida o derivatizada para introducir grupos adecuados reticulables según métodos bien conocidos en la técnica.

20 La superficie sólida sobre la que la inmovilización según la invención se desarrolla puede ser proporcionada por una variedad de materiales y puede de manera adecuada ser cualquier material de soporte de fase sólida usado normalmente en la inmovilización de proteínas.

La invención es aplicable a cualquier material de fase sólida que sea tratable para la inmovilización de proteínas o fragmentos de proteína, bien directamente o después de un tratamiento previo. Los materiales de soporte pueden ser granulados (p. ej. perlas o gránulos, generalmente usados en columnas de extracción) o en forma de hoja (por ej. membranas o filtros, placas de vidrio o plástico, placas de ensayo de microtitulación, tira reactiva, dispositivos de llenado capilar, o similares), que pueden ser planos, con pliegues, o fibras huecas o tubos. Las matrices siguientes son dadas como ejemplos y no son exhaustivas, tales ejemplos podrían incluir sílice (sílice amorfo poroso), es decir la serie FLASH de cartuchos conteniendo sílice irregular 60A (32-63 μm o 35-70 μm) suministradas por Biotage (una división de Dyax Corp.), soportes de agarosa o poliácridamida, por ejemplo la gama de sefarsa de productos suministrados por Amersham Pharmacia Biotech, o los soportes Affi-gel suministrados por Bio-rad. Además hay polímeros macroporosos, tales como los soportes Affi-Prep estables a la presión suministrados por Bio-rad. Otros soportes que podrían ser utilizados incluyen; dextrano, colágeno, poliestireno, metacrilato, alginato de calcio, vidrio de poro controlado, aluminio, titanio y cerámicas porosas. De forma alternativa, la superficie sólida puede comprender parte de un sensor dependiente de la masa, por ejemplo, un detector de resonancia de plasmón de superficie. Otros ejemplos de soportes comercialmente disponibles son explicados por Taylor, R.F. (1991), al que se hace referencia arriba. Convenientemente se provee una matriz comprendiendo una pluralidad de fragmentos de unión del antígeno individual unidos a una superficie sólida.

40 Los avances en biología molecular, particularmente a través de mutagénesis dirigida al sitio, permiten la mutación de residuos de aminoácidos específicos en una secuencia de proteína. La mutación de un aminoácido particular (en una proteína con estructura conocida o inferida) a una lisina o cisteína (u otro aminoácido deseado) pueden proporcionar un sitio específico para el acoplamiento covalente, por ejemplo. También es posible volver a diseñar una proteína específica para alterar la distribución de aminoácidos disponibles en la superficie implicada en el acoplamiento químico (Kallwass *et al*, Biotechnol. Lett., 15 (1), 29-34, 1993), controlando efectivamente la orientación de la proteína acoplada. Un procedimiento similar puede ser aplicado a fragmentos de anticuerpos, específicamente fragmentos VHH, suministrando así unos medios de inmovilización orientada sin la adición de colas de péptido VHH extra o dominios que contengan aminoácidos ya sean naturales o artificiales. Se prefiere la introducción de mutaciones en la región tipo del fragmento de anticuerpo, minimizando la rotura de la actividad de unión del antígeno del fragmento VHH. Una región particular del fragmento VHH adecuada para la mutagénesis se encuentra en la parte de la molécula que está cerca del dominio pesado constante, que ocurre en anticuerpos de cadena pesada natural.

55 Una ventaja particular de la invención es que se conserva una actividad biológica suficiente del dominio del anticuerpo, más específicamente del fragmento VHH después de la inmovilización para permitir que el fragmento acoplado funcione como un ligando de afinidad. En una forma de realización particular, se mantiene funcionalidad suficiente tras el acoplamiento covalente directo a la matriz deseada a través de una fracción reactiva que no contiene un brazo separador químico.

60 Los materiales preparados según la invención pueden ser usados en cualquier proceso en los que se necesite unir una molécula a un fragmento de anticuerpo inmovilizado. Las aplicaciones adecuadas ya sugerirán por sí mismas al experto corriente en la materia. Convenientemente, los materiales inmovilizados pueden ser usados en procesos de inmovilización tal como inmunoensayos, por ejemplo ELISA, o procesos de purificación de inmunoadsorción poniendo en contacto un material según la invención con una muestra para ensayo según métodos estándares convencionales en la técnica. De forma alternativa se puede usar un ensayo comprendiendo una pluralidad de fragmentos de unión del antígeno individuales ligados a una superficie sólida según la invención, por ejemplo, para probar la presencia de uno o más compañeros de enlace específico.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proveen sólo a título ilustrativo, no son exhaustivos y no deberían ser considerados como limitadores del ámbito de la invención. Las técnicas usadas para la manipulación y análisis de materiales de ácido nucleico pueden ser realizadas como se describe en Sambrook *et al.*, (1989), a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 110 *Aislamiento de fragmentos VHH de Péptidos Anti-ratón Fc y Anti-Anti Congelación*

El protocolo siguiente es tomado como un ejemplo de cómo se pueden aislar los fragmentos VHH específicos, clonados, expresados, luego acoplados en la matriz deseada:

15 Aunque los fragmentos VHH particulares descritos en este ejemplo fueron derivados de un repertorio inmunológico, también podrían haber sido seleccionados de una librería VHH nativa sintética/semisintética (ver WO 00/43507, Unilever).

Una llama fue inmunizada con fragmentos Fc obtenidos de IgG policlonales de suero de ratón o con un péptido Anti-congelación (AFP) de *Lolium perenne* (hierba AFP) (Sidebottom *et al.* (2000), Nature 406, 256). La llama fue sobrealimentada varias veces después de la inmunización inicial (un mes entre inyecciones) para aumentar la especificidad de la respuesta inmunitaria. Entonces pudo aislarse el ADN que codifica los fragmentos de VHH específicos usando métodos similares a aquellos descritos en WO 94/04678 (Casterman *et al.*). Si es necesario se puede seleccionar un repertorio inmunológico de fragmentos VHH contra el antígeno deseado como se describe en WO 94/18330 (Frenken *et al.*). De forma alternativa se pueden usar métodos de selección basados en exposición en fago para aislar el VHH anti-Fc o VHH anti-AFP produciendo clones de producción de repertorios inmunológicos.

La secuencia de aminoácidos codificada del fragmento VHH anti-Fc aislado usado en este ejemplo es presentado abajo:

30

VHH#1

35 (Clonado en *E. coli* como un VHH marcado con MYC-His6 en plásmido de producción pUR1490 y como VHH no marcado en plásmido de producción pUR1491):

40 **QVQLQDSGG GLVQAGGSL RLSCAVSGR TDSNYVMGW SRQAPGKGR EFIAAIHWS EGGTHYADS**
VKDRFTIFRD SAKNIMYLQ MNGLKPEDT AVYHCAHNS GTGAFDYWG QGTQVTVSS

La secuencia de aminoácidos del VHH anti-AFP usada en este ejemplo es como sigue:

45

VHH#2

50 (Clonado en *E. coli* como un VHH marcado con MYC-His6 en plásmido de producción pUR1492 y como VHH no marcado en plásmido de producción pUR1493):

55 **QVQLQESGG GLVETGGSL RLSCAASGR TISSYTIGW FRQAPGKER EFSVSHHFAS**
GGVTDYADS VKGRFTISR DNAKNTVYL EMNSLKPED TAVYYCAAS TFTISGYRA
LKAAYEYDY WGQGTQVTV SS

60 Las marcas usadas son C-MYC (mostrados en negrita abajo), reconocidos por anticuerpo monoclonal 9E10 (Munro, S., y Pelham, H.R. (1986) Cell 46, 291-300), seguido de un péptido 12-mer que codifica una señal de biotilación *in vivo* (mostrado en negrita y subrayado) y la cola de hexahistidina (mostrada en cursiva) para la purificación con IMAC (Hochuli, E., Bannwart, W., dōbeli, H., Gentz, R., y Stüber, D. (1988) Biotechnology 6, 1321-1325); la secuencia completa fundida al terminal de carboxi del VHH es presentada abajo:

65 **EQKLISEEDLN GAA LRSIFEAQKMEW HHHHHH**

ES 2 331 051 T3

Ejemplo 2

Producción y purificación de fragmentos VHH

5 Para la expresión en *Escherichia coli* usando los plásmidos de producción indicados en el ejemplo 1, los transformantes fueron cultivados en 400 ml de medio 2TY e inducidos con isopropil- β -D-thiogalactopiranosido como se describe (Skerra y Pluckthun (1991) Prot. Eng. 4, 971-979). Las células fueron cosechadas por centrifugado y lisadas en una Prensa Francesa. Se eliminó la proteína insoluble por centrifugado y de la fracción de proteína soluble se purificó el VHH marcado.

10 Los fragmentos de VHH aislados pueden de forma alternativa ser expresados en una eucariota inferior transformada tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* como se describe en WO 94/25591 (Frenken *et al.*). El VHH marcado puede ser purificado por IMAC usando material de columna TALON según las instrucciones del proveedor (Clontech). Los fragmentos VHH expresados sin marcas pueden ser aislados por cromatografía de afinidad con Proteína G o Proteína A por ejemplo usando columnas HiTrap Proteína A (Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante.

15 De forma alternativa, si los fragmentos VHH no pueden ser purificados por Proteína G o Proteína A entonces se puede usar cromatografía de intercambio iónico como alternativa, por ejemplo usando un sistema de cromatografía AKTAexplorer (Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante. De otro modo se podrían usar matrices que contengan antígeno acoplado para purificar los fragmentos.

20 Se realizó la purificación de los fragmentos de anticuerpos VHH no marcados (AFP anti-hierba y Fc anti-ratón) usando un concentrador Centriplus de 50 giros (Amicon); el concentrador fue centrifugado a 3,000 g (Sorvall RSCB). Se realizó la purificación del fragmento VHH marcado con anti-ratón Fc con IMAC usando material de columna TALON según las instrucciones del proveedor (Clontech).

Ejemplo 3

Acoplamiento de VHH a Sefarosa 4B activada con CnBr

30 Se acoplaron 200 μ g y 2 mg de fragmento VHH a Sefarosa 4B activada con CnBr (aprox. 0.3 g, Amersham Pharmacia Biotech, código de producto 17-0430-01) siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes del acoplamiento se realizó un intercambio de tampón por filtración en gel en columnas PD10 (Amersham Pharmacia Biotech), de modo que los fragmentos VHH estuvieran en un tampón compatible con el procedimiento de inmovilización. El material acoplado fue llenado en una columna de 1 cm de diámetro, para dar un volumen de lecho de aproximadamente 1.5 ml. La columna fue luego lavada con tampón A (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 150 mM NaCl pH 7.4) y preeluida con tampón de elución B (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 150 mM NaCl pH 2.1), luego lavada con aproximadamente 5 volúmenes de columna de tampón A.

Se acoplaron cuatro fragmentos diferentes a una matriz activada con CnBr de esta manera, tanto el VHH#1 anti-ratón Fc como el VHH#2 anti-hierba AFP; ambas versiones marcada y no marcada.

45 El análisis de las fracciones antes y después del acoplamiento en un gel teñido con Coomassie mostró que el grado de acoplamiento de tanto la versión marcada como la no marcada de los dos fragmentos VHH diferentes fue alto y no reveló ninguna diferencia en eficiencia de acoplamiento entre el VHH marcado y el no marcado (véase Fig. 1).

50 Este resultado demuestra que los fragmentos VHH pueden ser eficazmente acoplados a una superficie sólida a través de enlaces covalentes incluso cuando no hay ninguna cola peptídica para proporcionar sitios adicionales para la reticulación.

Ejemplo 4

Purificación de IgG monoclonales y policlonales con las columnas de afinidad de VHH anti-Fc

55 Para analizar el rendimiento de las matrices preparadas según el Ejemplo 3, se realizaron diferentes purificaciones. Después de acoplar ambos VHH Anti-ratón Fc marcado y no marcado, se cargó suero de ratón completo en las columnas. Los tampones para la purificación fueron tampón A: 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 150 mM NaCl pH 7.4, y tampón de elución B: 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 150 mM NaCl con una adición de 12 mM HCl, pH 2 final. La recogida de fracción fue hecha manualmente, las fracciones fueron inmediatamente neutralizadas con 10% (v/v) 0.2 M tampón Tris.HCl, sin ajustar el pH. En Fig. 2 se muestra un cromatograma de la señal de 280 nm de las fracciones recogidas.

65 Las fracciones eluidas fueron analizadas en gel teñido con Coomassie y transferencia Western usando conjugado de fosfatasa alcalina Ig anti-ratón para la detección según las instrucciones del proveedor (Promega) (véase Fig. 3).

ES 2 331 051 T3

Cuando se usa suero de ratón completo para la purificación de afinidad una fracción grande de los anticuerpos policlonales son ligados y eluidos, mientras que no se encontró ninguna proteína contaminante tal como albúmina de suero en las fracciones eluidas. Sólo una pequeña proporción de anticuerpos fue encontrada en la fracción no ligada, que son probablemente derivados de otros isotipos de Ig (tales como IgM, IgD u otros).

Los resultados obtenidos con VHH inmovilizado marcado y VHH inmovilizado no marcado son esencialmente los mismos, lo que demuestra que el suministro de una extensión peptídica no es necesario para asegurar que el VHH inmovilizado mantenga su capacidad de unión del antígeno.

Ejemplo 5

Purificación de péptido anti-congelación con columnas de afinidad de VHH

Después del acoplamiento del VHH AFP anti-hierba se cargó un caldo conteniendo hierba AFP en la columna. Los tampones para la purificación fueron tampón A: 10 mM Na₂ HPO₄ /NaH₂ PO₄, 150 mM NaCl pH 7.4, y tampón de elución B 10 mM Na₂ HPO₄ /NaH₂ PO₄, 150 mM NaCl con una adición de 12 mM HCl, pH 2 final. La recogida de las fracciones se efectuó manualmente; las fracciones fueron inmediatamente neutralizadas con 10% (v/v) 0.2 M de tampón Tris.HCl, sin ajustar el pH. En la Fig. 5 se muestra un cromatograma de la señal de 280 nm de la purificación de hierba AFP con la versión no marcada de VHH#2. La identidad del valor máximo eluido (Fracción 11) fue verificada usando análisis de secuencia de aminoácidos N-terminal. Este fue realizado usando la degradación de Edman en un secuenciador de proteínas LF 3000 (Beckman) según el protocolo del proveedor. La secuencia N-terminal encontrada fue Asp-Glu-Gln-Pro-Asn-Thr-Ile-Ser-Gly-, en otras palabras, los primeros nueve residuos del N-terminal de la secuencia conocida de AFP de *Lolium perenne*.

La versión no marcada de VHH#2 se purificó de la misma manera que la versión marcada.

Este ejemplo demuestra que la ausencia de una cola peptídica no afecta la capacidad de VHH unido a la superficie para enlazar antígenos.

Documentos citados en la descripción

Esta lista de documentos citados por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 0434317 A [0009]
- WO 9429457 A, Frenken [0014]
- WO 9108482 A [0010]
- WO 9923221 A [0015]
- WO 9404678 A, Casterman [0014] [0036]
- WO 0043507 A [0035]
- WO 9425591 A, Frenken [0014] [0024] [0043]
- WO 9418330 A, Frenken [0036]

Literatura no patente citada en la descripción

- Protein Immobilisation. *Marcel Dekker, Inc*, 1991 [0003]
- **Molina-Bolivar et al.** *J. Biomaterials Science-Polymer Edition*. 1998, vol. 9, 1103-1113 [0004]
- Bioconjugate Techniques. *Academic Press, Inc*, [0006]
- **Berry et al.** *Journal of Chromatography*, 1992, vol. 597, 239-245 [0006]
- **Spitznagel et al.** *BioTechnology*, 1993, vol. 11, 825-829 [0006]
- **Rao et al.** *Mikrochimica Acta*, 1998, vol. 128 (3-4), 127-143 [0008]
- **Pelham**, H.R. *Cell*, 1986, vol. 46, 291-300 [0009]
- **M. Arbabi-Ghahroudi et al.** *FEBS Letters*, 15 September 1997, vol. 414 (3), 521-526 [0013]
- **Davies et al.** camelisation. *Bio/technology*, 1995, vol. 13, 475-479 [0014]

ES 2 331 051 T3

• **Muyldermans et al.** *EMBO Journal*, 1998, vol. 17 (13), 3512-3520 [0015]

• **McCafferty, J. et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0021]

5 • **Davies et al.** *Bio Technology*, 1995, vol. 13, 475-479 [0025]

• **Kallwass et al.** *Biotechnol. Lett.*, 1993, vol. 15 (1), 29-34 [0030]

10 • **Sidebottom et al.** *Nature*, 2000, vol. 406, 256 [0036]

• **Munro, S.; Pelham, H.R.** *Cell*, 1986, vol. 46, 291-300 [0041]

15 • **Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Döbeli, H.; Gentz, R.; and Stüber, D.** *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 1321-1325 [0041]

• **Skerra; Pluckthun.** *Prot. Eng.*, 1991, vol. 4, 971-979 [0042]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Material inmunoactivo que comprende un único fragmento de unión de antígeno de único dominio de una inmunoglobulina naturalmente desprovista de cadenas ligeras, o una proteína que tiene las mismas propiedades o similares de unir antígenos localizada en un único dominio, cuyo fragmento está desprovisto de cualquier grupo polipéptido añadido, inmovilizado mediante enlaces covalentes en una superficie sólida.

10 2. Material según la reivindicación 1, donde el fragmento de unión de antígeno de un dominio es de una inmunoglobulina de camélido.

3. Material según la reivindicación 1 ó 2 donde uno o más residuos de aminoácidos en la región tipo del fragmento es sustituido por un aminoácido diferente para facilitar la inmovilización en la superficie sólida.

15 4. Material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la superficie sólida es seleccionada de poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poliacrilamida, celulosas, dextranos, polímeros sintéticos y copolímeros, látex, sílice, agarosa, metal, vidrio, carbono.

20 5. Material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 constituyendo todo o parte de una placa de microtitulación, una tira reactiva, un portaobjetos, una columna o perlas poliméricas.

6. Uso de un material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un proceso de inmunoadsorción.

7. Uso según la reivindicación 6 en un proceso de purificación de inmunoensayo o de inmunoafinidad.

25 8. Método para inmunoensayo o purificación comprendiendo poner en contacto un material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con una muestra de ensayo.

30 9. Matriz comprendiendo una pluralidad de fragmentos de unión de antígenos individuales de un solo dominio de una inmunoglobulina naturalmente desprovista de cadenas ligeras, o una pluralidad de proteínas que tienen las mismas propiedades o similares de enlace de antígeno localizadas en un único dominio, cuyos fragmentos son desprovistos de cualquier grupo polipéptido añadido, inmovilizado en una superficie sólida, mediante enlaces covalentes.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

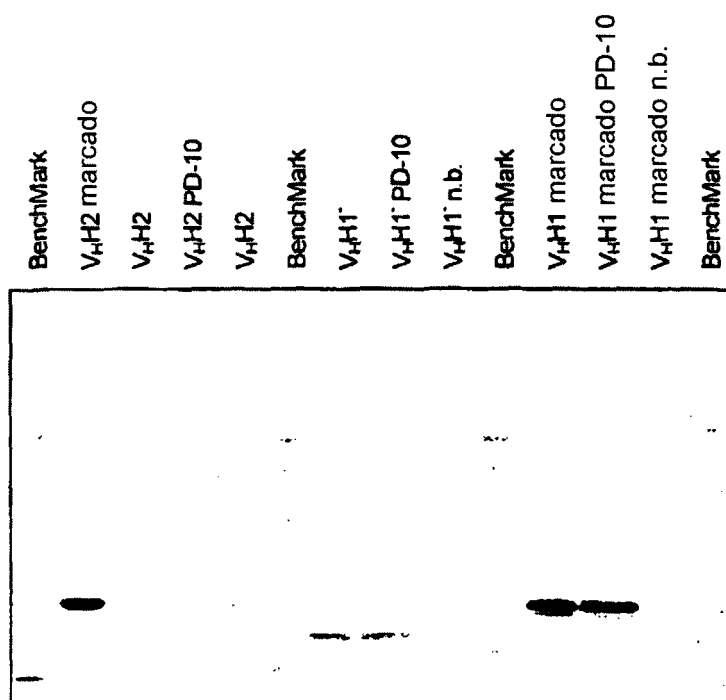


Figura 2

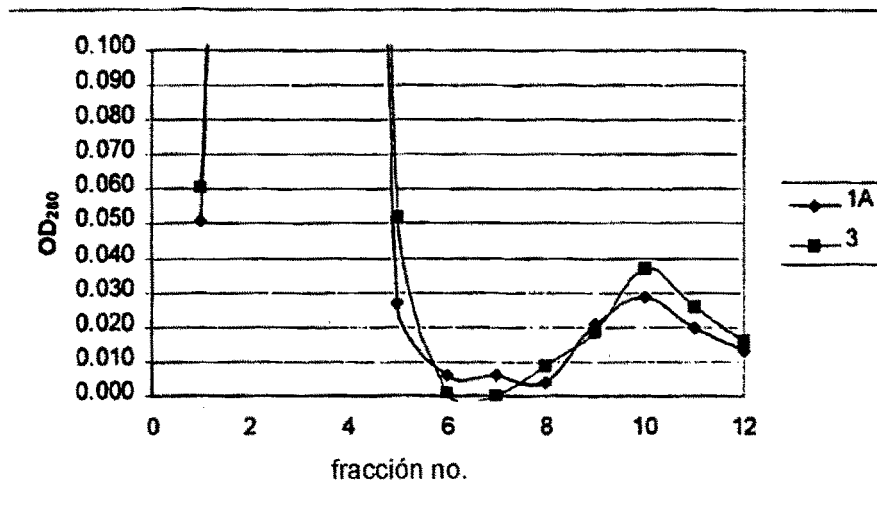


Figura 3

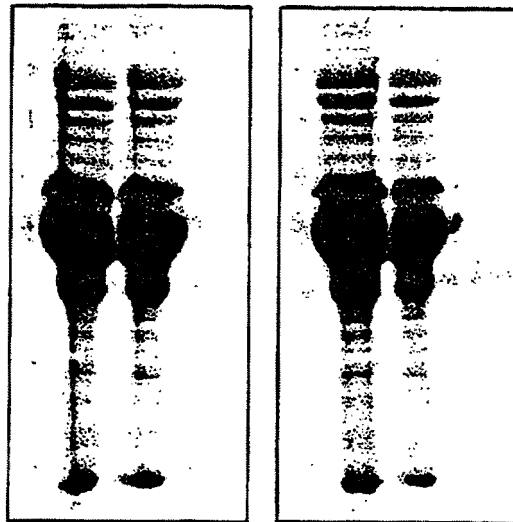


Figura 4

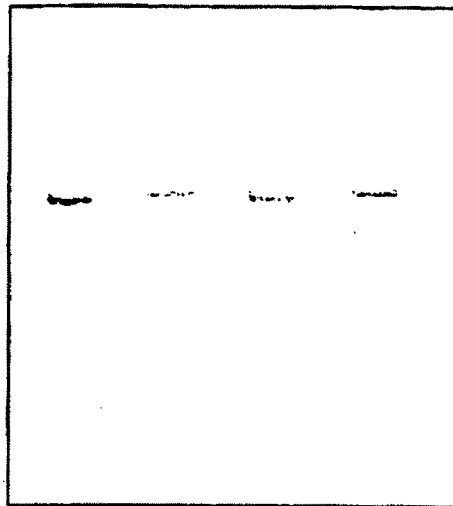
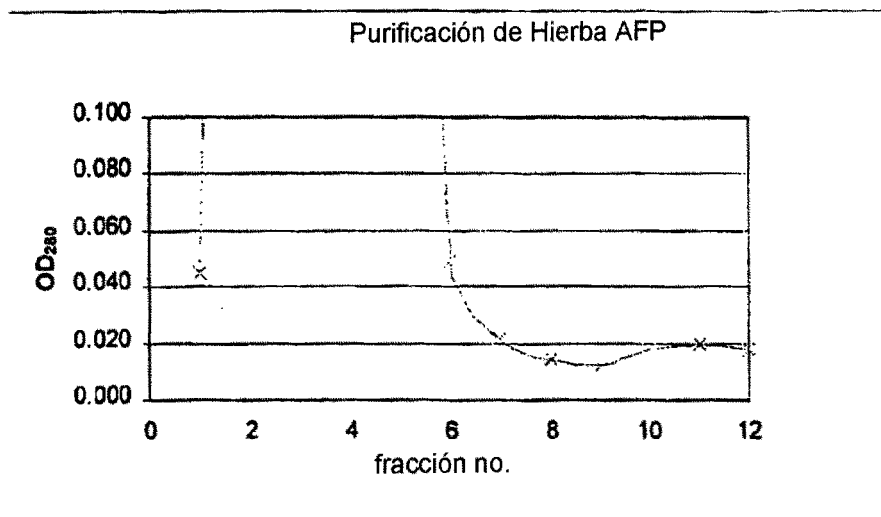


Figura 5



ES 2 331 051 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Unilever plc
Unilever NV

5

<120> inmovilización de proteína

<130> T3082

10

<160> 4

<170> PatentIn version 3.0

15

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

20

<213> Lama

<400> 1

25

Gln Val Gln Leu Gln Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Thr Asp Ser Asn Tyr
20 25 30

30

Val Met Gly Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Ile
35 40 45

35

Ala Ala Ile His Trp Ser Glu Gly Gly Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ile Met Tyr
65 70 75 80

40

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95

45

Ala His Asn Ser Gly Thr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

50

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

55

<213> Lama

60

65

ES 2 331 051 T3

<400> 2

1 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Thr Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Ile Ser Ser Tyr
 10 Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 15 Ser His His Phe Ala Ser Gly Gly Val Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 25 Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 Ala Ala Ser Thr Phe Thr Ile Ser Gly Tyr Arg Ala Leu Lys Ala Ala
 35 Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 40 50 55 60
 45 65 70 75 80
 50 85 90 95
 55 100 105 110
 60 115 120 125

<210> 3

<211> 32

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Secuencia de marcado para VHH

<400> 3

45 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala Leu Arg
 50 Ser Ile Phe Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His His His His His His
 55 1 5 10 15
 60 20 25 30

50 <210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> *Lolium perenne*

55

<400> 4

60 Asp Glu Gln Pro Asn Thr Ile Ser Gly
 65 1 5

65