



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 622**

51 Int. Cl.:
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)
A61K 49/14 (2006.01)
A61K 49/16 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06737830 .7**
96 Fecha de presentación : **10.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1866415**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Péptido etiqueta que contiene cisteína para la conjugación específica de sitio de proteínas.**

30 Prioridad: **18.03.2005 US 83508**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **SIBTECH, Inc.**
115A Commerce Drive
Brookfield, Connecticut 06804, US

72 Inventor/es: **Backer, Marina, V. y**
Backer, Joseph, M.

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 357 622 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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION**1. Campo de la invención**

5 [0001] La presente invención se refiere a un conjugado biológico que comprende proteínas que presentan las secuencias de proteína que codifican una etiqueta que contiene cisteína y un grupo de unión unido covalentemente a la etiqueta que contiene cisteína en la proteína. Asimismo, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados biológicos en combinación con entidades terapéuticas, diagnósticas, o de investigación seleccionadas.

2. Descripción de la técnica relacionada

10 [0002] La conjugación de proteínas recombinantes con diversas entidades se utiliza en varias áreas. Un área es la administración dirigida de agentes terapéuticos, diagnósticos y de investigación en células diana en el paciente con el fin de mejorar su eficacia y de minimizar los efectos secundarios potencialmente adversos. En este área, los agentes terapéuticos, diagnósticos y de investigación o sus portadores se conjugan químicamente con proteínas recombinantes de direccionamiento que pueden unirse selectivamente a células diana (revisión por Dubowchik y Walker, 1999). Los conjugados resultantes son estructural y funcionalmente heterogéneos debido a que se forman aleatoriamente mediante reacciones químicas con unos cuantos de entre varios grupos químicos disponibles, habitualmente grupos ϵ -amino de residuos lisina en la proteína de direccionamiento. Debido a que la conjugación aleatoria no discrimina entre residuos aminoácidos funcionalmente importantes y los dispensables en la proteína de direccionamiento, el procedimiento debería desarrollarse ajustado a medida y optimizarse caso por caso con el fin de incrementar la proporción de proteínas funcionalmente activas.

25 [0003] Otro área es la derivatización de superficies artificiales y/o composiciones en masa de dispositivos biomédicos o andamiajes de tejidos con proteínas con diana en determinados componentes del ambiente interno del organismo con el fin de mejorar la compatibilidad superficial con el ambiente y de modular las características deseadas, tales como la afinidad o rechazo de determinados componentes internos del organismo. En este área, las proteínas recombinantes se injertan covalentemente en el material mediante conjugación química aleatoria, habitualmente mediante grupos ϵ -amino de residuos lisina, que implica residuos aminoácidos tanto funcionalmente importantes como dispensables en las proteínas, resultando en productos heterogéneos con una fracción desconocida de proteínas funcionalmente activas.

30 [0004] Todavía otro área con problemas similares es la construcción de diversos biosensores u otros dispositivos funcionales con superficies derivatizadas con proteínas, que convierten los resultados de las interacciones entre la proteína "activa" y los componentes diana del ambiente en un resultado detectable, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, una señal detectable o los productos de actividad enzimática de proteínas inmovilizadas. En este área, también se conjugan químicamente proteínas recombinantes con superficies artificiales de estos dispositivos, habitualmente mediante grupos ϵ -amino de residuos lisina, rindiendo superficies heterogéneas con una fracción desconocida de proteínas funcionalmente activas.

35 [0005] Se han desarrollado varios métodos para la conjugación química de proteínas con superficies artificiales (ver, por ejemplo, la patentes US nº 5.492.840 de Malmqvist, nº 5.853.744 de Mooradian *et al.*, nº 6.033.719 de Keogh, Mann *et al.*, 2001; Kuhl y Griffith-Cima, 1996; Bentz *et al.*, 1998. Estos métodos se desarrollaron caso por caso con el fin de minimizar los daños a la proteína e incrementar la homogeneidad de la superficie.

40 [0006] Estos problemas han sido perfectamente reconocidos, y a lo largo de los años se han desarrollado varios enfoques para introducir en proteínas recombinantes residuos cisteína únicos para la conjugación específica de sitio de diversas entidades. Esta estrategia se basa en la observación de que residuos cisteína intrínsecos en las proteínas habitualmente se encuentran implicados en enlaces disulfuro intramoleculares o entre subunidades y no se encuentran fácilmente disponibles para la conjugación química. En teoría, la introducción de un único residuo cisteína que no afecte a la formación de enlaces disulfuro intrínsecos y que no afecte a la actividad funcional de la proteína recombinante puede proporcionar un grupo tiol disponible para la conjugación específica de sitio mediante enlaces conocidos de la técnica. Por ejemplo, varios grupos han informado de la introducción de cisteínas en fragmentos de anticuerpo Fv de una sola cadena (scFv) recombinantes, habitualmente en los extremos C-terminales o próximamente a ellos, con el fin de utilizar dichos residuos cisteína para la formación de diacuerpos y/o para la conjugación específica de sitio con diversas entidades (Adams *et al.*, 1993; Kipriyanov *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997; Marti *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Renard *et al.*, 2002; Albrecht *et al.*, 2004). Sin embargo, incluso para scFv, la presencia de una cisteína no apareada en el extremo C-terminal o próximamente a ella afecta significativamente al rendimiento, solubilidad y actividad funcional de la proteína (Schmiedl *et al.*, 2000). Futami *et al.*, 2000, introdujeron residuos cisteína en una posición próxima a los extremos N-terminal y C-terminal de la ARNasa I humana, resultando en una ARNasa I estabilidad. Sin embargo, el rendimiento y actividad enzimática del producto se redujeron significativamente. Además, esta ARNasa I mutante o sus fragmentos no fueron utilizados en otros productos.

[0007] Otro método para la modificación dirigida a sitio de las proteínas es la ligación mediada por inteína de diversas entidades con el extremo C-terminal de la proteína (ver, por ejemplo, Evans *et al.*, 1999; Tolbert y Wong, 2000; Macmillan *et al.*, 2000; Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Hofmann y Muir, 2002; Lovrinovic *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2004). Sin embargo, la aplicación de este método requiere el plegamiento correcto de la proteína fusionada con un dominio grande de inteína y la capacidad de resistir condiciones reductoras bastante fuertes durante la ligación mediada por inteína. Además, en ambos enfoques comentados anteriormente, la conjugación con un residuo cisteína disponible se encuentra limitada a entidades que no interfieren con actividades de la proteína a pesar de su estrecha proximidad al cuerpo de la proteína.

[0008] De esta manera, en el área de la administración dirigida basada en proteínas de compuestos terapéuticos, diagnósticos y de investigación, así como en el área de la construcción de diversos dispositivos y andamiajes con superficies derivatizadas con proteínas, en la técnica se requieren composiciones y métodos generales que: (1) permitan la conjugación específica de sitio de proteínas recombinantes con diversas entidades con el fin de producir productos más homogéneos de maneras que minimicen la interferencia con actividades funcionales de dichas proteínas, (2) conviertan fácilmente diversas proteínas recombinantes de interés en un formato adecuado para la conjugación específica de sitio, (3) puedan utilizarse con una amplia diversidad de entidades con las que resulta necesario conjugar la proteína recombinante de interés, y (4) no resulten en problemas inmunogénicos o de toxicidad al introducirlos en seres humanos. Se cree que la presente invención es una respuesta a dichos objetivos.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0009] En un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado biológico, comprendiendo: (a) un grupo de direccionamiento que comprende un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia polipeptídica SEC ID nº 2 y la secuencia polipeptídica de una proteína de direccionamiento seleccionada, y (b) un grupo de unión, presentando el conjugado biológico un enlace covalente entre el grupo tiol de SEC ID nº 2 y un grupo funcional en el grupo de unión.

[0010] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado biológico, que comprende: (a) un grupo de direccionamiento que comprende un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia polipeptídica SEC ID nº 2 y la secuencia polipeptídica de una proteína de direccionamiento seleccionada, y (b) un grupo de unión que comprende una proteína adaptadora unida covalentemente al grupo de direccionamiento, presentando la proteína adaptadora un grupo tiol; presentando el conjugado biológico un enlace disulfuro entre el grupo tiol de secuencia SEC ID nº 2 y el grupo tiol de la proteína adaptadora.

[0011] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para administrar selectivamente entidades seleccionadas en una diana de un paciente, comprendiendo un portador farmacéuticamente aceptable, y uno u otro de los conjugados biológicos anteriormente indicados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012] La invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada siguiente considerada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

la Fig. 1 es una representación de las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la etiqueta C4 fusionada genéticamente con la región de sitio de clonación múltiple mediante una molécula conectora G4S (panel A), y representación esquemática de un plásmido para la expresión bacteriana de proteínas recombinantes de fusión fusionados con la etiqueta C4 mediante una molécula conectora G4S (panel B).

La Fig. 2 es una representación esquemática de la conjugación específica de sitio entre una proteína recombinante de fusión etiquetada con C4 y una proteína adaptadora complementaria denominada HuS(C118) (panel A), una representación esquemática de una familia de proteínas adaptadoras basada en la ARNasa I humana capaz de conjugación específica de sitio con un residuo cisteína en la etiqueta C4 fusionada genéticamente con la proteína recombinante (panel B), lo que demuestra la conjugación espontánea a través de un enlace disulfuro entre C4-VEGF y HuS(C118), conduciendo a la aparición de nuevas bandas de proteínas sensibles a DTT en las muestras denominadas HuS-C4-VEGF en el gel SDS-PAGE (panel C), y una demostración de que la actividad ribonucleasa se reconstituye tras la formación del conjugado químico, pero no tras la mezcla física de proteína adaptadora y la proteína recombinante de fusión etiquetada con C4 (panel D).

La Fig. 3 ilustra que las actividades funcionales de varias proteínas recombinantes de fusión etiquetadas con C4 y de varias proteínas recombinantes de fusión etiquetadas con C4 y conjugadas con proteínas adaptadoras complementarias son comparables a las de las proteínas parentales. El panel A ilustra que en el ensayo de fosforilación de tirosinas de VEGFR-2 en células 293/KDR, las actividades funcionales del factor de crecimiento endotelial vascular etiquetado con C4 (C4-VEGF), del factor de crecimiento endotelial vascular de una sola cadena etiquetado con C4 (C4-scVEGF) y del conjugado HuS(C118)-C4-VEGF (HuS-C4-VEGF), son comparables a las del VEGF que no

contiene etiqueta C4. El panel B ilustra que las actividades funcionales de la anexina V etiquetada con C4 (C4-anexina) y de los conjugados HuS(C118)-C4-anexina V (HuS-C4-anexina) son comparables a la de la anexina V en un ensayo de unión de eritrocitos. El panel C ilustra que la capacidad de un fragmento catalíticamente inactivo etiquetado con C4 del factor letal del ántrax, C4-LFn, y del conjugado correspondiente HuS(C118)-C4-LFn (HuS-C4-LFn), son comparables a la de LFn en la protección de las células RAW frente a la actividad citotóxica de la toxina del ántrax LF/PA.

La Fig. 4 ilustra que la conjugación específica de sitio de HYNIC-maleimida (hidrocloruro de 5-maleimido-2-hidraziniopiridina), un quelante de ^{99m}Tc , con las proteínas de fusión y de actividad funcional C4-VEGF y C4-scVEGF como los conjugados. El panel A ilustra que las actividades funcionales de los conjugados HYNIC-C4-VEGF y HYNIC-C4-scVEGF es comparable a la del C4-VEGF parental en el ensayo de autofosforilación de tirosinas del VEGFR-2 en células 293/KDR. El panel B ilustra que los conjugados HYNIC-C4-VEGF e HYNIC-C4-scVEGF son comparables al C4-VEGF parental en sus capacidades de proteger a las células 293/KDR frente a la citotoxicidad de la proteína de fusión toxina-VEGF.

La Fig. 5 ilustra la conjugación específica de sitio de maleimida-polietilenglicol de 20 ó 40 kDa (PEG20 y PEG40, respectivamente) con C4-VEGF y la actividad funcional del conjugado PEG-C4-VEGF. El panel A ilustra el análisis de SDS-PAGE del conjugado PEG-C4-VEGF. El panel B ilustra que la actividad funcional del conjugado PEG-C4-VEGF es comparable a la de C4-VEGF parental en el ensayo de autofosforilación de tirosinas del VEGFR-2 en células 293/KDR.

La Fig. 6 ilustra la utilización de la etiqueta C4 y una proteína adaptadora complementaria HuS(C88, C118) para la construcción de los conjugados regulados por VEGF (Cy5.5-Hus-C4-VEGF) que contienen pigmento cianina Cy5.5 para la formación dirigida *in vivo* de imágenes fluorescentes de infrarrojo cercano. El panel A es un diagrama de flujo para la construcción y caracterización del conjugado Cy5.5-Hus-C4-VEGF. El panel B ilustra que la actividad funcional del conjugado Cy5.5-Hus-C4-VEGF es comparable a la del C4-VEGF parental en el ensayo de autofosforilación de tirosinas del VEGFR-2, mientras que la conjugación específica de sitio (Cy5.5-C4-VEGF) o aleatoria (Cy5.5-VEGF) de una cantidad similar de Cy5.5 por cada VEGF etiquetado con C4 reduce la actividad del VEGF. El panel C ilustra que el conjugado Cy5.5-Hus-C4-VEGF es comparable al C4-VEGF parental en su capacidad de proteger a las células 293/KDR frente a la citotoxicidad de la proteína de fusión toxina-VEGF, mientras que la conjugación específica de sitio (Cy5.5-C4-VEGF) o aleatoria (Cy5.5-VEGF) de una cantidad similar de Cy5.5 por cada VEGF etiquetado con C4 reduce la actividad del VEGF. El panel D ilustra la utilización del conjugado Cy5.5-Hus-C4-VEGF para la formación de imágenes *in vivo* de la vasculatura tumoral.

La Fig. 7 ilustra la utilización de la etiqueta C4 y de una proteína adaptadora complementaria HuS(C118) para la construcción de conjugados regulados por VEGF (Lip/Hus-C4-VEGF) que contienen liposomas cargados de doxorubicina ("DOXIL") para la administración dirigida de fármacos. El panel A es un diagrama de flujo para la construcción y caracterización del conjugado Lip/Hus-C4-VEGF. El panel B ilustra que la actividad funcional del conjugado Lip/Hus-C4-VEGF es comparable a la del C4-VEGF parental en el ensayo de autofosforilación de tirosinas del VEGFR-2. El panel C ilustra que los liposomas cargados de doxorubicina con diana en VEGF (Lip/Hus-C4-VEGF) resultan tóxicos para las células que expresan VEGFR-2 en un intervalo de concentraciones en el que los liposomas cargados de doxorubicina no dirigidos resultan ineficaces, encontrándose en la base del mecanismo mediado por receptor de toxicidad del conjugado Lip/Hus-C4-VEGF. El panel D ilustra que VEGF protege a las células 293/KDR frente a la actividad citotóxica del conjugado Lip/Hus-C4-VEGF.

La Fig. 8 ilustra la utilización de C4-scVEGF para la construcción de conjugados regulados por VEGF (Lip/C4-scVEGF) que contienen liposomas cargados de doxorubicina ("DOXIL") para la administración dirigida de fármacos. El panel A es un diagrama de flujo para la construcción y caracterización del conjugado Lip/C4-scVEGF. El panel B ilustra que en el ensayo de autofosforilación de toxinas del VEGFR-2, la actividad funcional del conjugado Lip/C4-scVEGF es comparable a la del C4-VEGF parental. El panel C ilustra que Lip/C4-scVEGF resulta tóxico para las células que expresan VEGFR-2 en un intervalo de concentraciones en el que los liposomas cargados de doxorubicina no dirigidos resultan ineficaces, encontrándose en la base del mecanismo mediado por receptores de la toxicidad del conjugado Lip/C4-scVEGF. El panel D ilustra que VEGF protege a las células 293/KDR frente a la actividad citotóxica del conjugado Lip/C4-scVEGF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] Tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención comprende composiciones y métodos que resultan útiles para la conjugación específica de sitio de las proteínas de fusión recombinantes con diversas entidades mediante un único residuo cisteína presente en un péptido de etiqueta introducido en la proteína. Los métodos de conjugación actuales conocidos de la técnicas se basan principalmente en el entrecruzamiento aleatorio de diversas entidades con residuos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina o

5 tirosina, que son abundantes en la proteína. Los residuos cisteína menos abundantes habitualmente se encuentran implicados en enlaces disulfuro intramoleculares que resultan esenciales para la actividad funcional de la proteína y que por lo tanto no se encuentran disponibles para la conjugación. En consecuencia, incluso en el caso de que la conjugación implique únicamente un residuo aminoácido por cada proteína, el producto final contiene una mezcla de proteínas modificadas en diferentes posiciones y por lo tanto de características heterogéneas de actividad, farmacocinética, farmacodinámica y distribución en tejidos. Además, la conjugación con residuos aminoácidos en la proteína en todo caso se encuentra limitada por el perjuicio que puede implicar para la actividad funcional de las proteínas. En consecuencia, los procedimientos de conjugación deben desarrollarse a medida caso por caso. Sin embargo, la conjugación a medida no permite un enfoque estandarizado para la adaptación rápida de diferentes proteínas para fines similares, por ejemplo para una administración dirigida del mismo reactivo de formación de imágenes, o la derivatización superficial del mismo dispositivo.

15 **[0014]** Para superar dichos obstáculos y otros, la presente invención da a conocer composiciones y métodos que resultan útiles para la conjugación específica de sitio de proteínas recombinantes con diversas entidades. El método se basa en la conversión de una proteína de interés en una proteína de fusión que comprende un péptido de etiqueta que contiene cisteína, denominado C4, fusionado mediante un péptido conector a un extremo N-terminal o C-terminal de la proteína de interés. Por definición, con el fin de que resulte útil, dichas proteínas de fusión deberían conservar sus actividades funcionales, y un residuo cisteína en el péptido de etiqueta debería encontrarse disponible para la conjugación específica de sitio con diversas entidades, incluyendo proteínas adaptadoras complementarias, capaces de formar un enlace disulfuro covalente con la cisteína de la etiqueta. Diversos enlaces para la conjugación de un grupo tiol de cisteína son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, las entidades derivatizadas con grupos maleimida, o grupos vinilsulfona, o con grupos tiol químicamente activados, pueden conjugarse con un grupo tiol en la etiqueta C4. Por otra parte, el grupo tiol en la etiqueta C4 puede modificarse con la formación de un enlace disulfuro activado que pueda reaccionar con grupos tiol disponibles en diversas entidades, o puede modificarse con reactivos bifuncionales para la conjugación con entidades que puedan reaccionar con el segundo grupo funcional.

20 **[0015]** De esta manera, ahora se ha descubierto que una etiqueta C4 de péptido de fusión que contiene cisteína puede proporcionar a una proteína fusionada a la etiqueta la capacidad de conjugarse químicamente con diversos componentes químicos. El residuo cisteína de la etiqueta C4 se utiliza para formar un enlace covalente con los componentes químicos, proporcionando de esta manera un enlace estable fuerte. Mediante el residuo cisteína de C4, pueden formarse enlaces estables entre la proteína etiquetada con C4 y una amplia diversidad de entidades, incluyendo fármacos, portadores de fármacos, agentes de contraste, portadores para agentes de contraste, radionucleidos, portadores para radionucleidos, diversas nanopartículas y micropartículas, incluyendo liposomas, puntos quantum, partículas paramagnéticas pequeñas y ultrapequeñas, otras proteínas o fragmentos de proteína, ácidos nucleicos, diversas moléculas modificadoras de proteínas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, así como superficies de diversos dispositivos, tales como dispositivos biomédicos, biosensores, o andamiajes de tejidos artificiales. En una realización, se une covalentemente una proteína adaptadora complementaria a la proteína etiquetada con C4 mediante un enlace disulfuro. La proteína adaptadora puede utilizarse como plataforma para la conjugación con diversas entidades indicadas anteriormente. La presente invención da a conocer que las proteínas etiquetadas con C4 conservan la actividad funcional de la proteína y que pueden conjugarse de modo específico de sitio con diversas entidades sin pérdida de actividad funcional *in vitro* o *in vivo*.

30 **[0016]** La formación de un enlace covalente ofrece varias ventajas para la presente invención. En primer lugar, la entidad unida covalentemente a la etiqueta C4 se encuentra alejada de las partes funcionales de la proteína. Además, una proteína adaptadora complementaria permite distanciar adicionalmente las entidades unidas de las partes funcionales de la proteína. En segundo lugar, el enlace covalente es fuerte, de manera que los materiales unidos a la proteína etiquetada con C4 no se disocian fácilmente en líquidos biológicos o en soluciones. En tercer lugar, el enlace y las condiciones para formar el enlace covalente son conocidos y pueden reproducirse fácilmente. En cuarto lugar, bajo determinadas condiciones conocidos por el experto en la materia resulta posible destruir el enlace covalente y permitir que los componentes se disocien. Por ejemplo, en el caso de que se forme un enlace disulfuro, pueden seleccionarse condiciones apropiadas para reducir este enlace y permitir que se disocie la proteína etiquetada con C4. Esta característica de la invención ofrece ventajas en el aspecto de que, por ejemplo, las superficies derivatizadas pueden regenerarse tras un periodo de tiempo predeterminado.

45 **[0017]** A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado entendido comúnmente por el experto en la materia a la que se refiere el objeto de la presente invención.

50 **[0018]** Tal como se utiliza en la presente memoria, "C4" se refiere a un fragmento mutante N-terminal de 15 aminoácidos de longitud de la ARNasa I humana con las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos siguientes:

60 AAAGAATCTTGCGCTAAAAAA.TTTCAACGTCAACACATGGACTCT (SEC ID nº 1)

Lys-Glu-Ser-Cys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gln-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser (SEC ID nº 2)

- 5 **[0019]** Aunque no debe esperarse que péptidos humanos alterados mínimamente resulten inmunogénicos en el ser humano y por lo tanto son realizaciones preferentes de etiquetas que contienen cisteína, se entiende que en algunas aplicaciones la inmunogenicidad no es un problema y por lo tanto estos péptidos pueden utilizarse tras la modificación mediante sustitución de aminoácidos, deleción de aminoácidos, inserción de aminoácidos y adición de aminoácidos, incluyendo la introducción de un residuo cisteína en diferentes posiciones en estos péptidos o la utilización de fragmentos correspondientes de ribonucleasas no humanas.
- 10 **[0020]** Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proteína de direccionamiento" se refiere a una proteína que puede interactuar selectivamente con receptores celulares u otras proteínas de superficie celular, o que puede interactuar selectivamente con determinados componentes del ambiente, libres o unidos a una superficie.
- 15 **[0021]** Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencia de molécula conectora" se refiere a una longitud inocua de ácido nucleico o proteína que une dos otras secciones de ácido nucleico o proteína.
- 20 **[0022]** Los términos "mutante" y "mutado" se refieren a secuencias de ácido nucleico o proteína que no se encuentran naturalmente. El término "truncado" se refiere a secuencias de ácido nucleico o proteína que son más cortas que las observadas en la naturaleza.
- 25 **[0023]** Tal como se define en la presente memoria, "conjugado biológico" se refiere a un complejo entre un grupo de direccionamiento y un grupo de unión y estabilizado mediante un enlace covalente. El término "grupo de direccionamiento" se refiere a una proteína que presenta un polipéptido que comprende C4 y una proteína de direccionamiento. La expresión "grupo de unión" se refiere a cualquier sustancia o superficie que puede unirse covalentemente al grupo de direccionamiento. La expresión "grupo funcional" se refiere a grupos químicos naturales o no naturales que interactúan químicamente con un grupo tiol. Un grupo funcional natural se refiere a un grupo químico que se observa naturalmente en el grupo de unión que puede interactuar químicamente con un grupo tiol. Un grupo funcional no natural se refiere a un grupo que se añade artificialmente al grupo de unión (por ejemplo la adición de un grupo maleimida o grupo vinilsulfona a polietilenglicol) de manera que el grupo artificial es químicamente reactivo con el grupo tiol del grupo de unión.
- 30 **[0024]** La expresión "proteína adaptadora" se refiere a una proteína que es complementaria (por ejemplo parte de una pareja de unión) y que puede interactuar con el grupo de direccionamiento para formar un enlace disulfuro específico entre dicha proteína y el grupo de direccionamiento. La expresión "proteína de fusión" se refiere a una proteína recombinante que contiene dos o más fragmentos de polipéptido que se encuentran codificados por secuencias de ADN que han sido combinadas con los métodos de tecnología de ADN recombinante de una forma que permite la expresión de la proteína de fusión en huéspedes adecuados.
- 35 **[0025]** Tal como se utiliza en la presente memoria, "portador" se refiere a moléculas naturales o sintéticas o agregados de las mismas que pueden asociarse covalente o no covalentemente con compuestos terapéuticos, diagnósticos o de investigación. Entre dichos portadores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, quelantes, polímeros naturales o sintéticos, incluyendo dendrímeros, copolímeros, polímeros derivatizados, liposomas, diversas partículas víricas y bacteriofágicas, diversas nanopartículas y micropartículas naturales y fabricadas, y perlas.
- 40 **[0026]** Tal como se utiliza en la presente memoria, "scVEGF" se refiere a un factor de crecimiento endotelial vascular de una sola cadena que comprende dos fragmentos de 3 a 112 aminoácidos de la isoforma VEGF₁₂₁ conectados cabeza con cola en una proteína de una cadena mediante un residuo de alanina y que presenta las secuencias de proteína y de ácido nucleico siguientes:

NH₂-Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val
 Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp
 Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
 Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile
 Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys
 Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Ala Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu
 Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
 Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile

Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg-COOH (SEC ID nº 4)

ATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTCAT
GGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGACCCTGGTGGACATCT
TCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCC
CTGATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCCCA
CTGAGGAGTCCAACATCACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGC
CAGCACATAGGAGAGATGAGCTTCCTACAGCACAACAAATGTGAATGCAGAC
CAAAGAAAGATAGAGCAAGAGCCATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATC
ACGAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATC
GAGACCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTT
CAAGCCATCCTGTGTGCCCCTGATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGG
GCCTGGAGTGTGTGCCACTGAGGAGTCCAACATCACCATGCAGATTATGCGG
ATCAAACCTCACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATGAGCTTCCTACAGCACA
ACAAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAGATAGAGCAAGA TGA (SEC ID nº 3)

[0027] Sin embargo, debido a la redundancia del código genético, cualquier ácido nucleico que codifique SEC ID nº 4 se encuentra comprendida en los ácidos nucleicos de la presente invención.

5 **[0028]** En todavía otra realización, el grupo de direccionamiento presenta la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID nº 14. Esta secuencia polipeptídica, que es una fusión genética de C4 y un VEGF de una sola cadena (scVEGF) que presenta la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID nº 4, se encuentra codificada por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID nº 13. Sin embargo, debido a la redundancia del código genético, cualquier ácido nucleico que codifique SEC ID nº 14 se encuentra comprendida en los ácidos nucleicos de la presente invención. Aunque scVEGF contiene 16 residuos de cisteína en cada molécula monocatenaria, las moléculas etiquetadas con C4 se repliegan en una conformación funcionalmente activa, de manera que el residuo cisteína en la etiqueta C4 puede conjugarse con diversas entidades, rindiendo conjugados con actividades funcionales comparables a las del VEGF no modificado.

15 **[0029]** Tal como se ha indicado anteriormente, en una realización, la presente invención se refiere a un conjugado biológico, que comprende: (a) un grupo de direccionamiento que comprende un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia polipeptídica SEC ID nº 2 y la secuencia polipeptídica de una proteína de direccionamiento seleccionada, y (b) un grupo de unión, en el que el conjugado biológico presenta un enlace covalente entre el grupo tiol de secuencia SEC ID nº 2 y un grupo funcional en el grupo de unión. La presente invención también se refiere a un conjugado biológico, que comprende: (a) un grupo de direccionamiento que comprende un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia polipeptídica SEC ID nº 2 y la secuencia polipeptídica de una proteína de direccionamiento seleccionada, y (b) un grupo de unión que comprende una proteína adaptadora unida covalentemente al grupo de direccionamiento, presentando la proteína adaptadora un grupo tiol, en el que el conjugado biológico presenta un enlace disulfuro entre el grupo tiol de secuencia SEC ID nº 2 y el grupo tiol de la proteína adaptadora. Cada uno de estos componentes se comenta en más detalle posteriormente. El grupo de direccionamiento preferentemente es una proteína que presenta un polipéptido que comprende el péptido C4 y una proteína de direccionamiento. Tal como se ha indicado anteriormente, la parte de péptido C4 del grupo de direccionamiento es un fragmento N-terminal mutante de 15 aminoácidos de longitud de la ARNasa I humana en la que la arginina en la posición 4 ha sido sustituido por cisteína. Este péptido particular ofrece varias ventajas en la presente invención. El origen humano reduce la probabilidad de inducir una respuesta inmunológica fuerte en un huésped humano. Además, un fragmento N-terminal de la ARNasa I humana es capaz de formar una hélice α que puede protegerlo frente a la formación de enlaces disulfuro con otros residuos cisteína en la proteína de fusión durante el repliegamiento y la purificación de la proteína. Finalmente, los fragmentos N-terminal y C-terminal de tipo salvaje enzimáticamente inactivos de la ARNasa I humana forman espontáneamente complejos no covalentes enzimáticamente activos, un fenómeno que se aprovecha en la presente invención para desarrollar proteínas adaptadoras complementarias capaces de formar un enlace disulfuro con un residuo de C4 en la etiqueta C4. El fragmento N-terminal mutante de 15 aminoácidos de longitud de la ARNasa I humana presenta las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos siguientes:

AAAGAATCTTGCGCTAAAAAATTTCAACGTCAACACATGGACTCT (SEC ID nº 1)

Lys-Glu-Ser-Cys-Ala-Lys-Lys-Phe-Gln-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser (SEC ID nº 2)

5 **[0030]** La parte de proteína de direccionamiento del grupo de direccionamiento es cualquier proteína que pueda unirse selectivamente a receptores celulares o a otras proteínas de superficie celular o de interactuar selectivamente con determinados componentes del ambiente, y que se encuentra genéticamente fusionada con el péptido C4. En realizaciones preferentes, la proteína de direccionamiento puede ser un factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), o una forma mutada o truncada del mismo, tal como VEGF₁₁₀, la anexina V humana, o una forma mutada o truncada de la misma, un fragmento catalíticamente inactivo del vector letal del ántrax, o una forma mutada o truncada del mismo, o un derivado del VEGF de una sola cadena, o una forma mutada o truncada del mismo.

10 **[0031]** En una realización, el grupo de direccionamiento presenta las secuencias polipeptídicas mostradas en las secuencias SEC ID nº 6 ó 8. Estas secuencias polipeptídicas, que son fusiones genéticas de C4 y VEGF₁₂₁ o VEGF₁₁₀, respectivamente, se encuentran codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en SEC ID nº 5 y 7, respectivamente. Sin embargo, debido a la redundancia del código genético, cualquier ácido nucleico que codifique SEC ID nº 6 ó 8 se encuentra comprendido en los ácidos nucleicos de la presente invención. Además, aunque las isoformas seleccionadas del VEGF (VEGF₁₂₁) contienen 18 residuos cisteína en cada molécula dimérica, las moléculas etiquetadas se repliegan en una conformación funcionalmente activa, en la que el residuo cisteína en la etiqueta C4 puede conjugarse con diversas entidades, rindiendo conjugados con actividades funcionales comparables a las del VEGF no modificado.

15 **[0032]** El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) controla el crecimiento de las células endoteliales mediante la interacción con varios receptores, entre los que la expresión del receptor KDR/flk-1 (VEGFR-2) se encuentra limitada mayoritariamente a las células endoteliales. En los organismos adultos, el crecimiento de las células endoteliales (angiogénesis) se produce, con la excepción del desarrollo del cuerpo lúteo, únicamente en diversas condiciones patológicas. De esta manera, la administración mediada por receptor de KDR/flk-1 (VEGFR-2) de entidades terapéuticas, diagnósticas, de contraste y de investigación de manera específica de sitio ligada a VEGF o a scVEGF, o ligada a VEGF o scVEGF mediante una proteína adaptadora complementaria, puede resultar útil en terapias para diversas patologías. Por otra parte, VEGF o scVEGF, PEGilado específicamente en un sitio, de circulación prolongada o liberable lentamente a partir de una matriz adecuada, así como VEGF o scVEGF conjugado con las superficies de dispositivos biomédicos, tales como stents, o andamiajes de tejidos, podría resultar útil para estimular la angiogénesis en situaciones isquémicas.

20 **[0033]** En otra realización, el grupo de direccionamiento presenta la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID nº 10. Esta secuencia polipeptídica, que es una fusión genética de C4 y anexina V, se encuentra codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID nº 9. Sin embargo, debido a la redundancia del código genético, cualquier ácido nucleico que codifique SEC ID nº 10 se encuentra comprendida en los ácidos nucleicos de la presente invención. Aunque la anexina V contiene un único residuo cisteína, las moléculas etiquetadas se repliegan en una conformación funcionalmente activa, en la que el residuo cisteína en la etiqueta C4 puede conjugarse con diversas entidades, rindiendo conjugados con actividades funcionales comparables a las de la anexina V no modificada. La anexina V interactúa con fosfatidilserina expuesta sobre la superficie de las células apoptóticas, y se utiliza como un marcador precoz del proceso apoptótico. De esta manera, la administración mediada por fosfatidilserina de entidades terapéuticas, diagnósticas o de investigación ligadas de manera específica de sitio a la anexina V podría resultar útil para inhibir o estimular la apoptosis.

25 **[0034]** En otra realización, el grupo de direccionamiento presenta la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID nº 12. Esta secuencia polipeptídica, que es una fusión genética de C4 y un fragmento catalíticamente inactivo del factor letal del ántrax, conocido como LFn, se encuentra codificado por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID nº 11. Sin embargo, debido a la redundancia del código genético, cualquier ácido nucleico que codifique SEC ID nº 12 se encuentra comprendido en los ácidos nucleicos de la presente invención. Aunque LFn no contiene residuos cisteína, las moléculas etiquetadas se repliegan en una conformación funcionalmente activa, de manera que el residuo cisteína en la etiqueta C4 pueda conjugarse con diversas entidades, rindiendo conjugados con actividades funcionales comparables a las del LFn no modificado. El fragmento catalíticamente inactivo del factor letal del ántrax, LFn, se empareja con otra proteína del ántrax, denominada antígeno protector (AP), que interactúa con los mismos receptores celulares que la combinación de factor letal catalíticamente activo/antígeno protector (LF/AP). De esta manera, la administración mediada por AP de entidades terapéuticas, diagnósticas o de investigación ligadas específicamente en un sitio a LFn podría resultar útil para mapear sitios con receptores para AP, o para la administración en células de compuestos que podrían interferir con la actividad citotóxica del factor letal.

30 **[0035]** En todavía otra realización, el grupo de direccionamiento presenta la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID nº 14. Esta secuencia polipeptídica, que es una fusión genética de C4 y un VEGF de una sola cadena (scVEGF) que presenta la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID nº 4, se encuentra codificada por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en SEC ID nº 13. Sin embargo, debido a la redundancia del código genético, cualquier ácido nucleico que codifique SEC ID nº 14 se encuentra comprendido en los ácidos

nucleicos de la presente invención. Tal como se ha indicado anteriormente, scVEGF comprende dos fragmentos de 3 a 112 residuos aminoácidos de la isoforma VEGF₁₂₁ conectados cabeza con cola en una proteína monocatenaria mediante un residuo alanina. Aunque scVEGF contiene 16 residuos cisteína en cada molécula monocatenaria, las moléculas etiquetadas se pliegan en una conformación funcionalmente activa, en la que el residuo cisteína en la etiqueta C4 puede conjugarse con diversas entidades, rindiendo conjugados con actividades funcionales comparables a las del VEGF dimérico no modificado.

[0036] Con referencia al grupo de direccionamiento anteriormente indicado, puede situarse una secuencia conectora entre el péptido C4 y la secuencia de la proteína de direccionamiento. Las secuencias conectoras, tales como los conectores Gly₄Ser o (Gly₄Ser)₃, se introducen en los vectores disponibles comercialmente para la expresión bacteriana de proteínas recombinantes y pueden introducirse fácilmente en vectores para la expresión de proteínas recombinantes en otros huéspedes, incluyendo, aunque sin limitación, células de mamífero, células de insecto, células de levadura y organismos transgénicos. Los conectores sirven para proporcionar una cierta distancia útil entre el péptido C4 y la proteína de direccionamiento. Aunque en las realizaciones presentadas la etiqueta C4 se sitúa en el extremo N-terminal de la proteína de direccionamiento, el experto en la materia apreciará que la etiqueta puede situarse en el extremo C-terminal de la proteína de direccionamiento, o en el interior del área funcionalmente prescindible de la proteína de direccionamiento, por ejemplo entre dos dominios funcionales de anticuerpo de una sola cadena, utilizando métodos comúnmente conocidos de manipulación genética.

[0037] La Fig. 1, panel A, muestra las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la etiqueta C4 fusionada genéticamente a una región de sitio de clonación múltiple en el plásmido de expresión típico mediante un conector G₄S. Tal como se muestra en el panel A de la Fig. 1, la secuencia de ácidos nucleicos completa incluye elementos de control y transcripción (promotor de T7, operador lac, sitio de unión ribosómica, y similares), así como la secuencia de ácidos nucleicos de la etiqueta C4. Una secuencia conectora separa la secuencia de C4 de un sitio de clonación múltiple, que puede utilizarse para introducir ácidos nucleicos de interés que funcionarán como la proteína de direccionamiento. Un sitio de terminación de T7 completa el ácido nucleico de longitud completa. La Fig. 1, panel B, muestra una representación esquemática de un plásmido para la expresión bacteriana de proteínas recombinantes de fusión fusionadas con la etiqueta C4 mediante un conector G₄S.

[0038] El grupo de direccionamiento del conjugado biológico puede ser una citoquina, quimoquina, factor de crecimiento, anticuerpo y fragmentos del mismo, enzima, y combinaciones de los mismos que puedan resultar útiles en diversas aplicaciones biomédicas o industriales. La parte de grupo de unión del conjugado biológico puede ser cualquier sustancia o superficie que pueda unirse covalentemente al grupo tiol de C4 del grupo de direccionamiento o al grupo funcional de la proteína adaptadora en el conjugado de adaptador/grupo de direccionamiento. Entre los ejemplos de grupos de unión útiles se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, fármacos, radionucleidos quelantes, polietilenglicol, pigmentos, lípidos, liposomas y superficies seleccionadas.

[0039] Entre los radionucleidos quelantes se incluyen compuestos tales como hidrocloreuro de 5-maleimido-2-hidrazinopiridina (HYNIC) para la carga con radionucleido de formación de imágenes o terapéutico. El polietilenglicol resulta útil para enlentecer la eliminación sanguínea de la proteína, y puede utilizarse en una forma derivatizada (por ejemplo modificado con maleimida o vinilsulfona) o no derivatizada. Entre los pigmentos útiles se incluyen, por ejemplo, el pigmento cianina Cy5.5, para la formación de imágenes fluorescentes en el infrarrojo cercano. Las superficies que pueden unirse al grupo tiol de C4 del grupo de direccionamiento o a un grupo funcional de la proteína adaptadora en el conjugado de adaptador/grupo de direccionamiento incluyen las superficies de una nanopartícula o micropartícula, la superficie de un dendrímero, las superficies de andamiajes de cultivo de tejidos, dispositivos biomédicos, y biosensores. Se entiende que, en el caso de que una entidad de unión incluya una superficie, puede utilizarse sin modificación, o pueden depositarse otros grupos químicos sobre la superficie mediante métodos conocidos de la técnica. Estos grupos químicos pueden utilizarse además para la modificación con reactivos bifuncionales que permitan la conjugación con la etiqueta C4 o con una proteína adaptadora mediante métodos conocidos de la técnica.

[0040] En una realización de la presente invención, el conjugado biológico presenta un enlace covalente entre el grupo tiol del péptido C4 (SEC ID n° 2) y un grupo funcional natural en el grupo de unión. De esta manera, se contempla que el grupo tiol del péptido C4 reaccione químicamente de manera directa con un grupo reactivo en el grupo de unión, de manera que se forme un enlace covalente estable. En realizaciones alternativas, el grupo reactivo que reacciona con el grupo tiol del péptido C4 puede introducirse artificialmente, por ejemplo mediante la utilización de agentes de entrecruzamiento bifuncionales conocidos de la técnica. Por ejemplo, puede introducirse un grupo maleimida en polietilenglicol o un lípido, y utilizarse para la reacción con el grupo tiol del péptido C4.

[0041] En una realización alternativa, el conjugado biológico de la presente invención incluye un grupo de unión que comprende una proteína adaptadora unida covalentemente al grupo de direccionamiento. En general, la proteína adaptadora es una ARNasa I mutante humana o un fragmento de la misma que incluye cisteína en la posición 118 (Cys₁₁₈). Entre los ejemplos de proteínas adaptadoras que resultan útiles en la presente invención se incluyen proteínas que presentan las secuencias polipeptídicas mostradas en SEC ID

nº 16, SEC ID nº 18, SEC ID nº 20 y SEC ID nº 22, que se describen en mayor detalle posteriormente.

[0042] Cuatro realizaciones particularmente preferentes de proteína adaptadora capaz de formar un enlace disulfuro con un residuo de C4 en la etiqueta de C4 se muestran en la Fig. 2, en la que el panel A proporciona una representación esquemática de la conjugación específica de sitio entre la proteína recombinante de fusión etiquetada con C4 y una proteína adaptadora complementaria. La Fig. 2, panel B, muestra una representación esquemática de una familia de proteínas adaptadoras basada en la ARNasa I humana mutante V118C T24N. La primera realización es un fragmento de la ARNasa I humana mutante V118C T24N denominado HuS(C118) (SEC ID nº 15 y 16). Pueden utilizarse grupos aminos de HuS(C118) para la conjugación con diversas entidades utilizando métodos conocidos de la técnica antes de la conjugación específica de sitio de HuS(C118) con proteínas etiquetadas con C4. La segunda realización es un fragmento de la ARNasa I humana mutante V118C T24N que contiene la sustitución N88C denominada HuS(C88,C118) (SEC ID nº 17 y 18). El grupo tiol de C88 en HuS(C88,C118) puede utilizarse para la conjugación con diversas entidades utilizando métodos conocidos de la técnica tras la conjugación específica de sitio de HuS(C88,C118) con proteínas etiquetadas con C4. La tercera y cuarta realizaciones se basan en una ARNasa-BH química que contiene un fragmento de 1 a 29 aminoácidos de la ARNasa A bovina que difiere del fragmento correspondiente de la ARNasa humana en cada posición y un fragmento de 30 a 127 aminoácidos de la ARNasa I humana (Gaynutdinov *et al.*, 2003). La tercera realización es el mutante V118C de la BH-ARNasa que contiene las sustituciones F8A y Q11P denominado BHR(A8,P11,C118) (SEC ID nº 19 y 20), que no requiere la eliminación de 20 residuos aminoácidos N-terminales antes de la conjugación específica de sitio con proteínas etiquetadas con C4. Pueden derivatizarse grupos amino de BHR(A8,P11,C118) con diversas entidades utilizando métodos conocidos de la técnica antes de la conjugación específica de sitio de HuR(A8,P11,C118) con proteínas etiquetadas con C4. La cuarta realización es la BH-ARNasa mutante V118C, que contiene A8, P11 y C88, denominada BHR(A8,P11,C88,C118) (SEC ID nº 21 y nº 22), que no requiere la eliminación de 20 residuos aminoácidos N-terminales antes de la conjugación específica de sitio con proteínas etiquetadas con C4. El grupo tiol C88 en BHR(A8,P11,C88,C118) puede utilizarse para la conjugación con diversas entidades utilizando métodos conocidos de la técnica tras la conjugación específica de sitio de BHR(A8,P11,C88,C118) con proteínas etiquetadas con C4. Utilizando métodos conocidos de la técnica resulta fácil construir otras proteínas adaptadoras basadas en la ARNasa I humana capaces de conjugación específica de sitio con proteínas etiquetadas con C4 y que proporcionan plataformas convenientes para la derivatización con diversas entidades. El experto en la materia apreciará que pueden utilizarse otras proteínas adaptadoras basadas en la ARNasa I humana además de las explícitamente indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, el experto en la materia apreciará que pueden construirse proteínas adaptadoras basándose en otras ribonucleasas, por ejemplo la ARNasa A bovina, con la condición de que dichas proteínas adaptadoras conserven la capacidad de formar conjugados con la etiqueta C4, o con etiquetas similares basadas en fragmentos N-terminales de otras ribonucleasas.

[0043] El panel C en la Fig. 2 proporciona evidencia de que la conjugación de C4-VEGF y HuS(C118) mediante un enlace disulfuro conduce a la aparición de nuevas bandas de proteínas sensibles a DTT en las muestras denominadas HuS-C4-VEGF en el gel de SDS-PAGE correspondientes a la conjugación de uno o dos adaptadores HuS(C118) con etiquetas C4 en una molécula dimerica de C4-VEGF. El panel D proporciona evidencia de que la actividad ribonucleasa se reconstituye tras la formación del conjugado químico, pero no tras la mezcla física de la proteína adaptadora HuS(C118) con la proteína de fusión recombinante etiquetada con C4 (panel D).

[0044] La proteína adaptadora puede derivatizarse con una diversidad de materiales funcionales para conseguir un resultado deseado. Por ejemplo, en una realización, la proteína adaptadora puede derivatizarse con un pigmento, tal como el pigmento Cy5.5 para la formación de imágenes ópticas, o con un lípido para asociar la proteína adaptadora con un liposoma que actúa como un portador para compuestos terapéuticos, diagnósticos o de investigación. En una realización, los liposomas pueden transportar o cargar doxorubicina ("DOXIL").

[0045] Los conjugados biológicos pueden combinarse con portadores farmacéuticamente aceptables para producir composiciones farmacéuticas para administrar selectivamente compuestos terapéuticos, de investigación o diagnósticos en una diana de un paciente. Dicha composición farmacéutica puede administrarse en un paciente, y permitirse que el conjugado biológico entre en contacto con la diana con el fin de administrar el compuesto en la diana en el paciente. En estas realizaciones, entre los portadores farmacéuticamente aceptables útiles se incluyen materiales tales como agua, gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, gomas, alcohol, vaselina o similares. La preparación farmacéutica de la invención debería incluir una cantidad del conjugado biológico que resulte efectiva para la actividad deseada. La dosis efectiva dependerá de la actividad del conjugado biológico particular utilizado y de esta manera se encuentra comprendida dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia la determinación para cualquier huésped mamífero particular u otro organismo huésped.

[0046] En general, se combina una cantidad farmacéuticamente efectiva del conjugado biológico de un modo convencional con el portador farmacéuticamente aceptable para producir la composición farmacéutica. La composición farmacéutica de la invención preferentemente se administra internamente, por ejemplo intravenosamente, en forma de preparaciones farmacéuticas convencionales, por ejemplo en excipientes

5 farmacéuticamente aceptables entéricos o parenterales convencionales que contiene portadores inertes orgánicos y/o inorgánicos tal como se ha indicado anteriormente. Las preparaciones farmacéuticas pueden encontrarse en formas sólidas convencionales, por ejemplo tabletas, grageas, supositorios, cápsulas o similares, o formas líquidas convencionales, tales como suspensiones, emulsiones o similares. Si se desea, pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes, agentes estabilizadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes, tampones, o sales utilizadas para el ajuste de la presión osmótica. Las preparaciones farmacéuticas también pueden contener otros materiales terapéuticamente activos.

EJEMPLOS

10 **[0047]** Los Ejemplos siguientes pretenden ilustrar, aunque en modo alguno limitar, el alcance de la presente invención. Todas las partes y porcentajes se proporcionan en peso y todas las temperaturas se proporcionan en grados centígrados, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

Ejemplo 1. Construcción y utilización de vectores de expresión que contienen C4 y un péptido conector.

1. Cepas bacterianas y plásmidos

15 **[0048]** *E. coli* cepa DH5 α -T se encuentra disponible comercialmente de Invitrogen (USA). Las cepas de *E. coli* BI21(DE3) y NovaBlue se encuentran disponibles comercialmente de Novagen (USA). El vector de expresión bacteriana pET29a(+) se obtuvo de Novagen (USA). El plásmido pLen-121 que contiene la secuencia de ADN codificante de la isoforma de 121 residuos aminoácidos del VEGF humano ha sido descrito en la patente US n° 5.219.739, incorporada como referencia en su totalidad en la presente memoria, y se obtuvo del Dr. J. Abraham (Scios Nova, Inc., USA). El plásmido pPAP1-1.6, que contiene la secuencia de ADN codificante de la anexina V humana, se obtuvo del Dr. J. Tait (University of Washington School of Medicine, Seattle, WA). El plásmido pGEX-KG LF254, que contiene la secuencia de ADN codificante del fragmento N-terminal no tóxico del factor letal del ántrax (LFn), se obtuvo del Dr. S. Leppla (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD).

25 2. Manipulaciones del ADN

30 **[0049]** Los enzimas de restricción y modificación utilizados en la presente invención se encuentran disponibles comercialmente en los Estados Unidos y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de células competentes, la transformación y el medio bacteriano siguieron Sambrook *et al.* (J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, 1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) o las instrucciones del fabricante. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando minipreparaciones Wizard Plus SV o sistemas de purificación de ADN Maxipreps (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación de los fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa se realizó utilizando el kit GeneClean Spin (Bio 101, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

35 3. Construcción de vectores para la expresión de proteínas fusionadas con la etiqueta C4

40 **[0050]** El vector pET/Hu(G₄S)₃ para la expresión de las proteínas recombinantes con una etiqueta Hu N-terminal fusionada con el ORF de la proteína mediante una molécula conectora (G₄S)₃ se construyó tal como se encuentra descrito (Backer *et al.*, 2004). La sustitución de aminoácidos R4C se introdujo en la etiqueta Hu del vector pET/Hu(G₄S)₃ mediante mutagénesis sitio-dirigida utilizando el kit de mutagénesis sitio-dirigida Gene-Tailor (Invitrogen). Se utilizaron los cebadores SEC ID n° 23 y SEC ID n° 24 para introducir la mutación R4C. El vector resultante se confirmó mediante secuenciación y se denominó pET/Hu-C4(G₄S)₃.

SEC ID n° 23: 5'-ATATACATATGAAAGAATCTTGCGCTAAAAAATTTTC

SEC ID n° 24: 5'-AGATTCTTTTCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTT

45 **[0051]** Se amplificó el ADN codificante de C4-G₄S mediante PCR utilizando el vector de ADN pET/Hu-C4(G₄S)₃ como molde, un cebador de sentido SEC ID n° 25 introduciendo el sitio XbaI, y un cebador antisentido SEC ID n° 26 introduciendo el sitio NcoI. La inserción se clonó en el vector pET29a(+) cortado con XbaI y NcoI. El vector resultante se confirmó mediante secuenciación y se denominó pET/Hu-C4-G₄S.

SEC ID n° 25: 5'-GGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC

SEC ID n° 26: 5'-ACTACCCATGGAACCGCCGCCACCAGATCCATG

50 4. Subclonación de fragmentos de ADNc codificantes de proteínas de interés en los vectores pET/Hu-C4(G₄S)₃ y pET/Hu-C4-G₄S

[0052] Los ADNs de los vectores pET/Hu-C4(G₄S)₃ y pET/Hu-C4-G₄S se cortaron separadamente con NcoI y se desfosforilaron. Todos los fragmentos de ADN que debían clonarse en los vectores anteriormente indicados se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores, introduciendo sitios NcoI en ambos extremos

de los fragmentos de ADN amplificados. El ADN codificante de la isoforma de 121 aminoácidos del VEGF humano se amplificó a partir del plásmido pLen-121 de ADN utilizando los cebadores SEC ID n° 27 y SEC ID n° 28. El ADN codificante de un fragmento N-terminal de 1 a 254 aminoácidos de longitud del factor letal del ántrax (LFn) se amplificó a partir del plásmido de ADN pGEX-KG LF254 utilizando los cebadores SEC ID n° 29 y SEC ID n° 30. El ADN codificante de la anexina V humana se amplificó a partir del plásmido pPAP1-1.6 utilizando los cebadores SEC ID n° 31 y SEC ID n° 32. Cada fragmento de ADN amplificado se cortó con NcoI, se purificó y se clonó en los sitios NcoI de los vectores pET/Hu-C4(G₄S)₃ y pET/Hu-C4-G₄S. Los clones con orientaciones correctas del ORF clonado se seleccionaron mediante PCR utilizando un cebador de sentido basado en un promotor de T7, y se confirmaron mediante secuenciación:

5
10
15

SEC ID n° 27: 5'-CACAAAGCCATGGCACCCATGGCAGAAGGAGGA
SEC ID n° 28: 5'-ACTACCCATGGTCACCGCCTCGGCTTGTCAC
SEC ID n° 29: 5'-CTGCTCCATGGGAGCGGGCGGTCATGGTGATG
SEC ID n° 30: 5'-ACTACCCATGGCTATAGATT
TATTTCTTGTTTCGTAAATTTATC
SEC ID n° 31: 5'-CACAAAGCCATGGCACAGGTTCTCAGAG
SEC ID n° 32: 5'-ACTACCCATGGTTAGTCATCTTCTCCACAGAGC

5. Expresión y purificación de proteínas de fusión recombinante con etiqueta C4.

20 **[0053]** Todas las proteínas se expresaron en *E. coli* BL21(DE3) cultivado en medio LB (Q-Biogen, Carlsbad, CA). Se indujo la expresión con IPTG 1 mM a una densidad óptica de entre 0,5 y 0,7 a 600 nm. Tras la inducción, los cultivos se cultivaron durante 2,5 a 3 horas a 37°C bajo agitación a 300 rpm; a continuación se recolectaron mediante centrifugación y se lisaron utilizando EmulsiFlex-C5 (Avestin, Ottawa, Canada).

25 **[0054]** Se expresó C4-VEGF en forma insoluble y se purificó de la manera siguiente: se solubilizaron los cuerpos de inclusión en urea 8 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Na₂SO₃ 80 mM, Na₂S₄O₆ 10 mM, DTT 10 mM, se incubaron durante 6 a 8 horas a 4°C bajo agitación; después se suplementaron con Tris[2-carboxietil]fosfina 2,5 mM (Pierce) y se incubaron durante 16 a 18 horas a 4°C. La proteína solubilizada se replegó mediante una diálisis en tres etapas: en primer lugar, 10 a 12 horas a 4°C en 10 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, urea 2 M, arginina 0,5 M, glutatión reducido 1 mM, glutatión oxidado 0,4 mM; en segundo lugar, 24 horas a 4°C en 50 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; en tercer lugar, 24 horas a 4°C en 50 volúmenes de NaOAc 20 mM (pH 5,5). Tras la diálisis, la solución se clarificó mediante centrifugación (15.000xg durante 20 minutos) y se purificó el C4-VEGF mediante cromatografía en heparina HP sefrosa (columnas pre-empaquetadas de 1 ml, Amersham). Para la conjugación, el grupo tiol de C4 en C4-VEGF se desprotegió mediante tratamiento suave con DTT utilizando un exceso de DTT de 1,2 molar a 34°C durante 45 minutos.

35 **[0055]** Para minimizar la implicación potencial del residuo cisteína presente en la posición 116 en el VEGF₁₂₁ nativo, los inventores prepararon una versión de C4-VEGF truncado en la posición 112 utilizando métodos conocidos de la técnica. La proteína truncada contenía 110 aminoácidos (un fragmento de 3 a 112 aminoácidos de VEGF₁₂₁) y por lo tanto se denominó C4-VEGF₁₁₀. El C4-VEGF₁₁₀ se expresó y se purificó tal como se ha indicado anteriormente y mostró actividades similares a las de C4-VEGF en ensayos de cultivo de tejidos.

40 **[0056]** Para optimizar adicionalmente el VEGF etiquetado con C4, los inventores construyeron un VEGF de una sola cadena fusionado con un único péptido etiqueta C4 mediante un péptido conector G₄S (C4-scVEGF). En general, la manipulación, expresión, replegamiento y purificación de las proteínas monoméricas resulta más simple que las de las proteínas oligoméricas, o incluso diméricas, tales como las isoformas nativas del VEGF. Además, se diseñó el scVEGF para evitar la formación de monómeros inactivos del VEGF que habitualmente se encuentran presentes en las preparaciones de VEGF dimérico, para simplificar cualquier re-manipulación proteica del VEGF, para simplificar la expresión, replegamiento y purificación, y para simplificar la conjugación de los grupos de unión a una única etiqueta C4. En primer lugar, se cortó el vector de ADN pET/Hu-C4-G₄S con BamHI y se desfosforiló. El ADN codificante de un fragmento de 3 a 112 aminoácidos de longitud del VEGF humano se amplificó a partir del plásmido pLen-121 utilizando un cebador de sentido (SEC ID n° 33) introduciendo el sitio BamHI inmediatamente cadena arriba del codón 3 del VEGF, e introduciendo un cebador antisentido (SEC ID n° 34) un codón de parada inmediatamente cadena abajo del codón 112 del VEGF y un sitio BamHI inmediatamente después del codón de parada. El fragmento de ADN amplificado se purificó, se cortó con BamHI, y se clonó en el sitio BamHI del vector pET/Hu-C4-G₄S. Se seleccionó la orientación correcta del ORF clonado mediante PCR utilizando un cebador de sentido basado en el promotor de T7. El plásmido de ADN purificado a partir de los clones seleccionados se confirmó mediante secuenciación y se denominó pET/C4(G₄S)VEGF₁₁₀.

55 SEC ID n° 33: 5'-CACGGATCCGGTGGCGGCGGTAGTGGT

SEC ID nº 34: 5'-CACGGATCCTCATCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCTGC

[0057] El vector de ADN pET/C4(G₄S)VEGF₁₁₀ se cortó con NcoI y se desfosforiló. Se amplificó el ADN codificante del fragmento de 3 a 112 aminoácidos del VEGF humano a partir del plásmido pLen-121 mediante PCR utilizando un cebador de sentido (SEC ID nº 35) introduciendo el sitio NcoI inmediatamente cadena arriba del codón 3 del VEGF, e introduciendo el cebador antisentido (SEC ID nº 36) una citosina inmediatamente cadena abajo del codón 112 del VEGF (para compensar el desplazamiento del ORF), y un sitio NcoI inmediatamente después de la citosina introducida. El fragmento de ADN amplificado se purificó, se cortó con NcoI y se clonó en el sitio NcoI del vector pET/C4(G₄S)VEGF₁₁₀. Se seleccionaron los clones con dos copias de VEGF₁₁₀ mediante PCR utilizando un cebador de sentido basado en el promotor de T7 y un cebador antisentido basado en el terminador de T7. El ADN aislado a partir de cuatro clones seleccionados aleatoriamente se secuenció y para la propagación se seleccionó un clon que contenía un tándem de VEGF₁₁₀ con una orientación de VEGF₁₁₀ de cabeza con cola. El plásmido seleccionado, denominado pET/C4(G₄S)scVEGF se transformó en células *E. coli* cepa BL21(DE3) competentes para la expresión de las proteínas.

SEC ID nº 35: 5'-CACAAAGCCATGGCACCCATGGCAGAAGGAGGA

SEC ID nº 36: 5'-ACTACCCATGGCTCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCTGC

[0058] El C4-scVEGF se expresó y se purificó tal como se ha indicado anteriormente, y mostraba actividades similares a las del C4-VEGF en ensayos de cultivo de tejidos. Se recuperó C4-scVEGF con ~50% de los grupos tiol de C4 disponibles para la conjugación. Para la conjugación, se desprotegió el grupo tiol de C4 en C4-VEGF mediante tratamiento suave con DTT utilizando 0,5 equivalentes molares de DTT.

[0059] Se expresó C4-LFN en una forma citoplasmática soluble y se purificó de la manera siguiente: se dializó la parte soluble del lisado bacteriano frente a 200 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, durante 20 horas a 4°C, se clarificó mediante centrifugación (15.000g durante 20 minutos), y se pasó a través de una columna de sefarosa-Q FF. Las fracciones que contenían C4-LFN se agruparon, se dializaron frente a 100 volúmenes de NaOAc 20 mM, pH 6,5, durante 20 horas a 4°C, y se purificaron en heparina-sefarosa-HP, seguido de cromatografía de interacción hidrofóbica en butil-sefarosa FF (columnas pre-empaquetadas de 1 ml, Amersham). El rendimiento de C4-LFN fue de entre 8 y 10 mg/l, pureza >98% mediante SDS-PAGE, seguido de tinción segura SimplyBlue (Invitrogen).

[0060] Se purificó la C4-anexina tal como se ha descrito para Hu-anexina (Backer *et al.*, 2004). Dependiendo de la naturaleza de la molécula conectora, y la proteína, se encuentra implicado un residuo cisteína en la etiqueta C4 en grado variable en componentes mixtos de disulfuro y redox del tampón de plegamiento. En caso necesario, los residuos cisteína pueden desprotegerse con DTT bajo condiciones que se optimizan para cada proteína C4.

6. Construcción y expresión de proteínas adaptadoras.

[0061] 6.1. Se construyó una ARNasa-127H-1-29B/30 quimérica (BH-ARNasa) que comprendía un fragmento de 1 a 29 aminoácidos de la ARNasa A bovina y un fragmento de 30 a 127 aminoácidos de la ARNasa I humana, y se expresó y se purificó tal como se ha descrito (Gaynutdinov *et al.*, 2003). Se introdujo la mutación V118C en el plásmido de ADN pET29/1-29B-127H-ARNasa mediante mutagénesis sitio-dirigida utilizando el kit de mutagénesis dirigida Gene-Tailor (Invitrogen) y los cebadores SEC ID nº 37 y SEC ID nº 38. Se confirmó la sustitución de VC118 mediante secuenciación; la proteína se denominó BH-ARNasa(C118). Se expresó la BH-ARNasa(C118) y se purificó tal como se ha descrito para la BH-ARNasa de tipo salvaje (Gaynutdinov *et al.*, 2003). La presencia de un grupo tiol reactivo se sometió a ensayo mediante reacción con el reactivo tiol N-(1-pireno)-maleimida (Molecular Probes, Eugene, OR) seguido de análisis de RP-HPLC tal como se ha descrito (Backer *et al.*, 2000). La proteína adaptadora HuS(C118) se obtuvo mediante digestión limitada de la BH-ARNasa(C118) con subtilisina (Sigma) tal como se ha descrito para la BH-ARNasa (Gaynutdinov *et al.*, 2003).

SEC ID nº 37: 5'-AAGGCTCTCCGTACGTTCCGTGTCATTTGACGCG

SEC ID nº 38: 5'-CGGAACGTACGGAGAGCCTTCGCATGCAAC

6.2. HuS(C88,C118)

[0062] Se introdujo la mutación N88C en el plásmido de ADN pET29/1-29B/30-127H-ARNasa(V118C) mediante mutagénesis sitio-dirigida utilizando los cebadores SEC ID nº 39 y SEC ID nº 40. La sustitución N88C se confirmó mediante secuenciación y la proteína se denominó BH-ARNasa(C88,C118). La BH-ARNasa(C88,C118) se expresó, se purificó y se digirió con subtilisina, rindiendo proteína adaptadora HuS(C88,C118) tal como se ha indicado anteriormente para la BH-ARNasa(C118).

SEC ID nº 39: 5'-TCACTGACTGCCGTCTTACTTGCGGATCCCGTT

SEC ID nº 40: 5'-AGTAAGACGGCAGTCAGTGATATGCATAGAA

6.3. HuR(A8,P11,C118)

[0063] Las mutaciones Q11P y F8A se introdujeron en consecuencia en el plásmido de ADN pET29/1-29B/30-127H-ARNasa(V118C) mediante mutagénesis sitio-dirigida utilizando los cebadores SEC ID nº 41 a 44, respectivamente. Ambas sustituciones se confirmaron mediante secuenciación y la proteína se denominó BH-ARNasa(A8,P11,C118). Se expresó la BH-ARNasa(A8,P11,C118) y se purificó tal como se ha indicado anteriormente para la BH-ARNasa(C118).

SEC ID nº 41: 5'- GCAGCCAAGTTTGAGCGGCCGCACATGGACTC

SEC ID nº 42: 5'- GCCGCTCAAACCTTGCTGCTGCAGTTTCCTT

SEC ID nº 43: 5'- GGAAACTGCAGCAGCCAAGGCTGAGCGGCCGC

10 SEC ID nº 44: 5'- CTTGGCTGCTGCAGTTTCCTTCATATGTATAT

7. Construcción y expresión de proteínas utilizadas en los ensayos.

7.1. SLT-VEGF.

[0064] El plásmido pET/VEGF₁₂₁-SLT/L codificante de la proteína de fusión SLT-VEGF que portaba la etiqueta S N-terminal y la etiqueta His ha sido descrita anteriormente (Backer y Backer, 2001). Se amplificó la secuencia codificante de ADN de SLT-VEGF mediante PCR a partir del plásmido de ADN pET/VEGF121-SLT/L utilizando cebadores (SEC ID nº 45) que introducían el sitio NdeI (SEC ID nº 46) y el sitio XhoI. El producto purificado mediante PCR se cortó con restrictasas NdeI y XhoI, se purificó y se clonó en los sitios NdeI-XhoI del vector pET29a(+) (Novagen). El plásmido resultante se confirmó mediante secuenciación y se denominó pET29/SLT-VEGF. Se expresó SLT-VEGF en BL21(DE3) tal como se ha indicado anteriormente para las proteínas portadoras de C4, y se purificó de la manera siguiente: los cuerpos de inclusión se solubilizaron en urea 8 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Na₂SO₃ 80 mM, Na₂S₄O₆ 10 mM, DTT 10 mM y se incubaron durante 6 a 8 horas a 4°C bajo agitación; después se suplementaron con Tris[2-carboxietil]fosfina 5 mM (Pierce) y se incubaron durante 16 a 18 horas a 4°C. Las proteínas solubilizadas se replegaron mediante una diálisis en tres etapas: en primer lugar, durante 8 a 10 horas a 4°C en 10 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, urea 2 M, arginina 0,5 M, glutatión reducido 1 mM, glutatión oxidado 0,4 mM; en segundo lugar, 24 horas a 4°C en 100 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 al 0,01%, y en tercer lugar, 24 horas a 4°C en 100 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 20 mM. Tras la diálisis, la solución se clarificó mediante centrifugación (15.000xg durante 20 minutos) y se purificó el SLT-VEGF mediante cromatografía en sefarosa Q HiTrap (columnas pre-empaquetadas de 1 ml, Amersham).

30 SEC ID nº 45: 5'-AAAAACATATGAAGGAATTTACCTTAGACTTCTCG

SEC ID nº 46: 5'-TACTCGAGTCACCGCCTCGGCTTGTCAC

7.2. Hu-VEGF.

[0065] Se construyó la proteína de fusión Hu-VEGF₁₂₁ que portaba una etiqueta Hu de tipo salvaje N-terminal tal como se ha descrito en Backer *et al.*, 2003. Se expresó Hu-VEGF₁₂₁ y se replegó a partir de cuerpos de inclusión tal como se ha indicado anteriormente para C4-VEGF, con las modificaciones siguientes: el plegamiento a partir de cuerpos de inclusión se realizó mediante una diálisis en dos etapas: durante 8 a 10 horas a 4°C en 10 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, urea 2 M, arginina 0,5 M, glutatión reducido 1 mM y glutatión oxidado 0,4 mM; en segundo lugar, 24 horas a 4°C en 50 volúmenes de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Además, para la purificación final de Hu-VEGF₁₂₁, se llevó a cabo una cromatografía en SP-sefarosa FF HiTrap seguido de heparina-HP-sefarosa (columnas pre-empaquetadas de 1 ml, Amersham).

8. Actividades funcionales de proteínas de fusión recombinantes con etiqueta C4.

[0066]

A. Actividad de VEGF. Se sometieron a ensayo las actividades funcionales del VEGF y los conjugados basados en VEGF en dos ensayos. En el primer ensayo, se llevó a cabo la estimulación de la autofosforilación de VEGFR-2 de la manera siguiente: se trasladaron células 293/KDR prácticamente confluyentes tras ayuno durante la noche (DMEM/FBS al 0,5%) a DMEM sin suero con vanadato sódico 0,5 mM, durante 20 minutos a 37°C; después se estimularon con VEGF durante 10 minutos a 37°C, se lisaron y se analizaron mediante transferencia western utilizando conjugado antifosfotirosina RC20:HRPO (BD Transduction Labs, USA). En el segundo ensayo, se llevó a cabo la protección de las células 293/KDR frente al efecto citotóxico de SLT-VEGF de la manera siguiente. Se sembraron células 293/KDR en placa de 96 pocillos 20 horas antes del experimento, 1.000 células/pocillo. Se mezclaron con SLT-VEGF cantidades variables de VEGF o conjugados basados en medio VEGF de cultivo completo y se añadieron a las células en pocillos por triplicado a una concentración final de SLT-VEGF de 1 nM. Las células viables se cuantificaron 96 horas después utilizando el kit de proliferación celular acuoso de una solución CellTiter 96[®] (Promega, USA).

B. Actividad de la anexina V. Se sometieron a ensayo las actividades funcionales de la C4-anexina y la HuS-C4-anexina a partir de su capacidad de competir con FITC-anexina (Sigma) para la unión a eritrocitos que expresaban fosfatidilserina procedentes de sangre humana estabilizada (4C Plus Cell Control, Beckman Coulter, USA) tal como se ha descrito (Tait *et al.*, 1995). Brevemente, se incubaron diez millones de eritrocitos (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 136 mM, CaCl₂ 2,5 mM) durante 15 minutos a TA. Las células se peletizaron, se resuspendieron en un tampón de unión suplementado con EDTA 5 mM, y se peletizaron nuevamente. Se midió la fluorescencia de FITC-anexina en los sobrenadantes a λ_{ex} 485 nm/ λ_{em} 520 nm.

C. Actividad del LFn. Se sometieron a ensayo C4-LFn y Hus-C4-LFn para su capacidad de proteger las células RAW frente a los efectos citotóxicos del LF de longitud completa en presencia de AP. Se sembraron células RAW264.7 en placas de 96 pocillos, 15×10^3 células/pocillo, 20 horas antes del experimento. Se mezclaron cantidades variables de LFn, C4-LFn o Hus-C4-LFn con LF y AP (List Biological, USA) en medio de cultivo DMEM completo, y se añadieron a células en pocillos por triplicado a concentraciones finales de 2 nM de AP y 0,2 nM de LF. Tras 2,5 horas de incubación a 37°C en 5% de CO₂, se determinaron los números de células viables mediante el kit de ensayo de proliferación celular acuoso de una solución CellTiter 96® (Promega).

9. Líneas celulares.

[0067] Las células renales embrionarias transformadas humanas HEK293 (CRL-1573) y los monocitos de ratón RAW 264.7 (TIB-71) se obtuvieron de la American type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las células 293/KDR que expresaban $2,5 \times 10^6$ VEGFR-2/célula fueron desarrollados por SibTech, Inc. (Newington, CT; Backer y Backer, 2001a). Todas las células se mantuvieron en DMEM (Life Technologies, USA) suplementado con suero de feto bovino al 10% (Gemini, USA), glutamina 2 mM (Life Technologies, USA) y penicilina-estreptomina (Life Technologies, USA) a 37°C, 5% de CO₂.

Ejemplo 2: conjugación específica de sitio de proteínas etiquetadas con C4 con proteína adaptadora HuS(C118).

[0068] El protocolo incluía la conjugación específica de sitio de proteínas etiquetadas con C4 con la proteína adaptadora HuS(C118) y el ensayo de las actividades funcionales de los conjugados en cultivo de tejido.

[0069] Se mezclaron HuS(C118) preparado tal como se ha indicado anteriormente y proteínas etiquetadas con C4, tal como C4-VEGF, o C4-anexina, o C4-LFn, en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, se incubó a 4°C durante 16 horas, y después se analizó mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. El análisis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras reveló nuevos productos proteicos formados en las mezclas durante la incubación (fig. 2C, carriles sin DTT). Los pesos moleculares de las proteínas en estas bandas correspondían al peso molecular de conjugados que portaban una o dos moléculas de HuS por cada proteína parental, respectivamente. Bajo condiciones reductoras, estas bandas desaparecieron, y únicamente eran detectables las bandas correspondientes a las proteínas parentales y HuS(C118) de 12 kDa (fig. 2C, carriles con adición de DTT). Los conjugados se purificaron en primer lugar en una columna de péptido Hu para eliminar el HuS(C118) libre y, en caso necesario, mediante cromatografía de intercambio iónico para eliminar las proteínas parentales libres.

[0070] Se sometieron a ensayo las actividades funcionales de los conjugados en ensayos de cultivo de tejidos indicados anteriormente. La actividad del conjugado HuS-C4-VEGF era similar a la del C4-VEGF en la inducción de la autofosforilación de tirosinas del VEGFR-2 en células 293/KDR (Fig. 3, panel A). El conjugado HuS-C4-anexina era activa en competencia con FITC-anexina para la unión a los eritrocitos que expresaban fosfatidilserina procedentes de sangre humana estabilizada con una IC₅₀ de 11+3 nM por conjugado frente a una IC₅₀ de 9+4 nM para la anexina V recombinante según informa Tait *et al.*, 1995 (Fig. 3, panel B). HuS-C4-LFn era tan activo como C4-LFn en la protección de las células RAW 264.7 proporcionada por LF en presencia de AP (Fig. 3, panel C). Conjuntamente, estos datos indican que la conjugación de proteína adaptadora a diferentes proteínas etiquetadas con C4 no destruye su actividad.

Ejemplo 3: conjugación específica de sitio de C4-VEGF y C4-scVEGF al radionucleido quelante, hidrócloro de 5-maleimido-2-hidrazinopiridina.

[0071] El protocolo incluía la conjugación específica de sitio de C4-VEGF y C4-scVEGF al radionucleido quelante químicamente activo hidrócloro de 5-maleimido-2-hidrazinopiridina (Solulink, San Diego, CA) y someter a ensayo el conjugado en cultivo de tejidos.

[0072] Se mezcló C4-VEGF, preparado tal como se ha indicado anteriormente, con dimetilformamida disuelta en hidrócloro de 5-maleimido-2-hidrazinopiridina, en lo sucesivo denominado HYNIC, en la proporción molar HYNIC/proteína de 3:1 en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. El producto, denominado HYNIC-C4-VEGF, se purificó en una columna PD-10 (Amersham, USA) equilibrada con tricina 0,114 M, pH 6,9. Se utilizó una RP-HPLC analítica (Fig. 4, panel A) para determinar la concentración de proteína mediante detección de la densidad óptica a 216 nm y la concentración de HYNIC mediante la detección de la densidad óptica a 310 nm. Bajo las condiciones seleccionadas, la proporción de HYNIC a C4-VEGF en HYNIC-C4-VEGF purificado era de ~1.

[0073] Se conjugó C4-scVEGF, preparado tal como se ha indicado anteriormente, con HYNIC, y se purificó tal como se ha indicado anteriormente, y la proporción de HYNIC a C4-scVEGF en el producto purificado denominado HYNIC-C4-VEGF era de ~1.

5 **[0074]** Se sometió a ensayo la actividad funcional del grupo VEGF en HYNIC-C4-VEGF y HYNIC-C4-scVEGF en dos ensayos de cultivo de tejidos tal como se ha indicado anteriormente: inducción de la autofosforilación de las tirosinas del VEGFR-2 en células 293/KDR (Fig. 4, panel B) y protección de las células 293/KDR frente a la actividad citotóxica de SLT-VEGF (Fig. 4, panel C). En ambos ensayos las actividades de HYNIC-C4-VEGF y HYNIC-C4-scVEGF eran comparables a las del C4-VEGF no modificado, indicando que la conjugación de C4-VEGF o de C4-scVEGF con HYNIC no destruía la actividad de la proteína.

10 **Ejemplo 4.** Conjugación específica de sitio de C4-VEGF con polietilenglicol.

[0075] El protocolo incluía la conjugación específica de sitio de C4-VEGF110 con polietilenglicol funcionalizado con grupo maleimida químicamente activo (Nektar Therapeutics) y el ensayo del conjugado en cultivo de tejidos.

15 **[0076]** Se mezcló C4-VEGF110, preparado tal como se ha indicado anteriormente, con maleimida-polietilenglicol (PEG) de 20 kDa ó 40 kDa a una proporción de PEG a proteína de 3:1 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Los productos, denominados PEG20-C4-VEGF y PEG40-C4-VEGF, se purificaron a partir de C4-VEGF no reaccionado y PEG mediante filtración en gel HPLC en una columna equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Se utilizó una RP-HPLC analítica para determinar la concentración de proteína mediante detección de la densidad óptica a 216 nm. El análisis de transferencia western de los productos VEGF PEGilados reducidos con anticuerpo
20 contra VEGF reveló una banda correspondiente a una masa molecular aparente de 55 kDa y una banda de intensidad aproximadamente igual correspondiente a monómero VEGF no modificado (Fig. 5, panel A), indicando en que la mayor parte de los dímeros de VEGF, únicamente se había conjugado una etiqueta C4 con PEG.

25 **[0077]** Se sometió a ensayo la actividad funcional de PEG-C4-VEGF en ensayo de cultivo de tejidos de la inducción de la autofosforilación de las tirosinas de VEGFR-2 en células 293/KDR (Fig. 5, panel B para PEG40-C4-VEGF). En este ensayo las actividades de PEG-C4-VEGF eran comparables a las del C4-VEGF no modificado, indicando que la conjugación específica de sitio de C4-VEGF con polietilenglicol no destruía la actividad de la proteína.

30 **Ejemplo 5.** Conjugación específica de sitio del pigmento cianina Cy5.5 con el conjugado HuS-C4-VEGF.

[0078] El protocolo incluía la preparación de HuS(C88,C118), su conjugación con C4-VEGF, la purificación del conjugado Hus-C4-VEGF resultante, y la conjugación de dicho conjugado con un pigmento cianina Cy5.5, rindiendo el conjugado denominado Cy5.5-Hus-C4-VEGF (Fig. 6, panel A). Con fines comparativos, C4-VEGF se modificó aleatoriamente con NHS-Cy5.5 en grupos amino hasta la proporción 1:1, o se modificó con maleimida-Cy5.5 en el residuo C4 en la etiqueta C4. Se sometieron a ensayo las actividades funcionales del grupo VEGF en todos los conjugados que contenían Cy5.5 en dos ensayos de cultivo de tejidos, tal como se ha indicado anteriormente: inducción de la autofosforilación de las tirosinas de VEGFR-2 (Fig. 6, panel B), y protección de las células 293/KDR frente a la actividad citotóxica del SLT-VEGF (Fig. 6, panel C). En ambos ensayos sólo las actividades del conjugado Cy5.5-Hus-C4-VEGF eran comparables a las del C4-VEGF no modificado, subrayando la eficacia de utilizar una proteína adaptadora capaz de unirse a la etiqueta C4 para la derivatización de las proteínas.

45 **[0079]** Se sometió a ensayo la utilidad de Cy5.5-Hus-C4-VEGF para la obtención de imágenes en ratones Balb/c hembra que portaban tumores de adenocarcinoma mamario de ratón 4T1 subcutáneo. Las imágenes, obtenidas con un aparato KODAK Image Station 2000MM dotado de un filtro de paso de banda a 630 nm y un filtro de pase largo a 700 nm, indicaban que el conjugado Cy5.5-Hus-C4-VEGF se localizaba preferentemente en la periferia del tumor primario (Fig. 6, panel D). Esta localización preferente resultó inhibida en ratones pretratados con proteína SLT-VEGF, que destruye las células positivas para VEGFR-2 en los tumores (Backer *et al.*, presentado para su publicación), indicando que la acumulación de conjugado Cy5.5-Hus-C4-VEGF en el tumor se encuentra mediado por receptor de VEGF y que puede utilizarse para la obtención de imágenes
50 específicas de la vasculatura tumoral.

Ejemplo 6. Utilización de la etiqueta C4 y una proteína adaptadora unida covalentemente a esta etiqueta para la construcción de conjugados regulados por VEGF que contienen liposomas cargados de fármaco para la administración dirigida de fármacos.

55 **[0080]** El protocolo incluía la preparación de HuS(C118), su conjugación con PEG-lípido-maleimida, la inserción de HuS(C118) lipidado en liposomas cargados de doxorubicina, que conduce a un constructo estandarizado denominado Lip/HuS(C118) y la conjugación de este constructo con C4-VEGF, rindiendo Lip/HuS-C4-VEGF (Fig. 7, panel A). Se sometió a ensayo la actividad funcional del grupo VEGF en el conjugado Lip/Hus-C4-VEGF en un ensayo de cultivo de tejidos indicado anteriormente: la inducción de la fosforilación de tirosinas de VEGFR-2 en células 293/KDR (Fig. 7, panel B). En este ensayo, la actividad del

VEGF de los liposomas con Lip/Hus-C4-VEGF era comparable a la del C4-VEGF no modificado, subrayando la eficacia de utilizar una proteína adaptadora capaz de unirse a la etiqueta C4 para la derivatización de proteínas.

5 **[0081]** Una exposición de 15 minutos de células 293/KDR a Lip/HuS-C4-VEGF resultó en una inhibición dependiente de dosis del crecimiento celular (Fig. 7, panel C), mientras que cantidades equivalentes de liposomas cargadas con doxorubicina no dirigidos (disponibles comercialmente bajo el nombre comercial "DOXIL") derivatizados con HuS(C118) por sí solas no resultaron tóxicas para estas células, indicando la existencia de un mecanismo mediado por receptor de VEGF de citotoxicidad de los liposomas dirigidos con Lip/Hus-C4-VEGF. Este mecanismo se confirmó adicionalmente a partir de la capacidad del VEGF de inhibir la citotoxicidad de Lip/Hus-C4-VEGF de un modo dependiente de dosis (Fig. 7D).

Ejemplo 7. Utilización de la etiqueta C4 para la construcción de conjugados regulados por scVEGF que contienen liposomas cargados de fármaco para la administración dirigida de fármacos.

15 **[0082]** El protocolo incluía la preparación de C4-scVEGF, su conjugación con PEG-lípido-maleimida, y la inserción de C4-scVEGF lipidado en liposomas cargados de doxorubicina ("DOXIL") (Fig. 8, panel A). Se sometió a ensayo la actividad del grupo VEGF en el conjugado Lip/C4-scVEGF en un ensayo de cultivo de tejidos indicado anteriormente: la inducción de la fosforilación de tirosinas de VEGFR-2 en células 293/KDR (Fig. 8, panel B). En este ensayo, la actividad del VEGF de liposomas con Lip/C4-scVEGF era comparable a la del C4-VEGF no modificado, subrayando la eficacia de utilizar C4-scVEGF.

20 **[0083]** Una exposición de 15 minutos de las células 293/KDR a Lip/C4-scVEGF resultó en una inhibición dependiente de dosis del crecimiento celular (Fig. 8, panel C), mientras que cantidades equivalentes de liposomas no dirigidos cargados de doxorubicina ("DOXIL") no resultaron tóxicas para estas células, indicando la existencia de un mecanismo de citotoxicidad mediado por el receptor de VEGF de los liposomas dirigidos con Lip/C4-scVEGF. Este mecanismo se confirmó adicionalmente a partir de la capacidad del VEGF de inhibir la citotoxicidad de Lip/Hus-C4-VEGF de un modo dependiente de dosis (Fig. 8D).

25 REFERENCIAS

- Adams, G. P., McCartney, J. E., Tai, M. S., Oppermann, H., Huston, J. S., Stafford, W. F., Bookman, M. A., Fand, I., Houston, L. L., Weiner, L. M. (1993) Highly specific in vivo tumour targeting by monovalent and divalent forms of 741 F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Res.* 53, 4026-4034.
- Albrecht, H., Burke, P. A., Natarajan, A., Xiong, C. Y., Kalicinsky, M., DeNardo, G. L., and DeNardo, S. J. (2004) Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand. *Bioconjugate Chemistry.* 15, 16-26.
- Backer, M. V., and Backer, J.M. (2001) Targeting endothelial cells overexpressing VEGFR-2: selective toxicity of Shiga-like toxin-VEGF fusion proteins. *Bioconj. Chem.* 12, 1066-1073.
- Backer, M. V., and Backer, J. M. (2001a) Functionally active VEGF fusion proteins. *Protein. Exp. Purif.* 23, 1-7.
- Backer, M. V., Gaynutdinov, T., Aloise, R., Przekop, K., and Backer, J. M. (2002a) Engineering the bovine S-protein for targeted modification. *Prot. Express. Purif.* 26, 455-461.
- Backer, M. V., Gaynutdinov, T. I., Gorshkova, I. I., Crouch, R. J., Hu, T., Aloise, R., Arab, M., Przekop, K., and Backer, J.B. (2003) Humanized docking system for assembly of targeting drug delivery complexes. *J. Contr. Release.* 89, 499-511.
- Backer, M. V., Gaynutdinov, T., Patel, V., Jehning, B., Myshkin, E., and Backer, J.M. (2004) Adapter protein for site-specific conjugation of payloads for targeted drug delivery. *Bioconj. Chem.* 15, 1021-1029.
- Bentz, H., Schroeder, J. A., and Estridge, T. D. (1998) Improved local delivery of TGF- β 2 by binding to injectable fibrillar collagen via difunctional polyethylene glycol. *J. Biomed. Mater. Res.* 39, 67-123.
- Dubowchik, G. M., and Walker, M. A. (1999) Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs. *Pharmacol Ther.* 83, 67-123
- Evans, T. C., Benner, J., and Xu, M. Q. (1999) The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem.* 274, 3923-3926
- Futami, J., Tada, H., Seno, M., Ishikami, S., Yamada, H. (2000) Stabilization of human RNase 1 by introduction of a disulfide bond between residues 4 and 118. *J. Biochem.* 128, 245-250.

- Gaynutdinov, T., Myshkin, E., Backer, J.M., and Backer, M.V. (2003) Chimeric ribonuclease as a source of human adapter protein for targeted drug delivery. *Prot. Eng.* 16, 771-775.
- Gupta, S., Eastman, J., Silski, C., Ferkol, T., and Davis, P. B. (2001) Single chain Fv: a ligand in receptor-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 8, 586-592.
- Hofmann, R. M. and Muir, T. W. (2002) Recent advances in the application of expressed protein ligation to protein engineering. *Current Opin. Biotech.* 13, 297-303.
- Kipriyanov, S. M., Dubel, S., Breitling, F., Konterman, R. D., Little, M. (1994) Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies. *Mol. Immunol.* 31, 1047-1058.
- Kuhl, P.R. and Griffith-Cima, L.G. (1996) Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. *Nature Medicine.* 2, 1022-1027.
- Li, L., Olafsen, T., Anderson, A. L., Wu, A., Raubitschek, A. A., Shively, J. E. (2002) Reduction of kidney uptake in radiometal labeled peptide linkers conjugated to recombinant antibody fragments. Site-specific conjugation of DOTA-peptides to a Cys-diabody. *Bioconjugate Chem.* 13, 985-995.
- Lovrinovic, M., Seidel, R., Wacker, R., Schroeder, H., Seitz, O., Engelhard, M., Goody, R. S., and Niemeyer, C. M. (2003) Synthesis of protein-nucleic acid conjugates by expressed protein ligation. *Chem. Commun.* 822-823.
- Macmillan, D., and Bertozzi, C. R. (2000) New directions in glycoprotein engineering. *Tetrahedron* 56, 9515-9525.
- Mann, B. M., Schmedlen, R. H., West, J. L. (2001) Tethered-TGF- β increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials*, 22, 439-444.
- Marty, C., Scheidegger, P., Ballmer-Hofer, K., Klemenz, R., and Schwendener, R. A. (2001) Production of functional single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in *Pichia pastoris*. *Prot. Express. & Purif.* 21, 156-164.
- Mukhopadhyay, J., Kapanidis, A. N., Mekler, V., Kortkhon-jia, E., Ebright, Y. W., Ebright, and R. H. (2001) Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription: Fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. *Cell* 106, 453-463.
- Renard, M., Belkadi, L., Hugo, N., England, P., Altschuh, D., and Bedouelle, H. (2002) Knowledge-based design of reagentless fluorescent biosensors from recombinant antibodies. *J. Mol. Biol.* 318, 429-442.
- Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C. H., Queitsch, I., and Dubel, S. (2000) Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Meth.* 242, 101-114.
- Tait, J. F., Engelhardt, S., Smith, C., and Fujikawa, K. (1995) Pourokinase-annexin V chimeras. Construction, expression, and characterization of recombinant proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 21594-21599.
- Tolbert, T. J., and Wong, C. H. (2000) Intein-mediated synthesis of proteins containing carbohydrates and other molecular probes. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5421-5428.
- Wang, D., Berven, E., Li, Q., Uckun, F., Kersey, J. H. (1997) Optimization of conditions for formation and analysis of anti-CD 19 FVS 191 single-chain Fv homodimer (scFv) ϕ ₂. *Bioconjugate Chem.* 8, 64-70.
- Wood, R. J., Pascoe, D. D., Brown, Z. K., Medicott, E. M., Kriek, M., Neylon, C., and Peter L. Roach, P. L. (2004) Optimized Conjugation of a Fluorescent Label to Proteins via Intein-Mediated Activation and Ligation. *Bioconjugate Chem.* 15, 366-372.
- Xu, L., Huang, C. C., Huang, W., Tang, W. H., Rait, A., Yin, Y. Z., Cruz, I., Xiang, L. M., Pirolo, K. F., and Chang, E. H. (2002) Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol. Cancer Therap.* 1, 337-346.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0085]

- 5 <110> Backer, Marina V.
Backer Joseph M.
- <120> PÉPTIDO ETIQUETA QUE CONTIENE CISTEÍNA PARA LA CONJUGACIÓN ESPECÍFICA DE SITIO DE PROTEÍNAS
- 10 <130> 102131-300
- <150> 09/872,712
- <151> 2001-06-01
- 15 <150> 60/209,660
- <151> 2000-06-06
- <160> 46
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 45
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fragmento de ADN mutante de la ARNasa I humana
- 30 <400> 1
- aaagaatcct gcgctaaaaa attcaacgt caacacatgg actct 45
- <210> 2
- <211> 15
- 35 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 357 622 T3

<223> Fragmento mutante N-terminal de 15 aminoácidos de longitud de la ARNasa I humana

<400> 2

Lys Glu Ser Cys Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser
1 5 10 15

5

<210> 3

<211> 666

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> ADN de factor de crecimiento vascular endotelial de una sola cadena (SCVEGF)

<221> CDS

<222> (1)...(666)

15

<400> 3

atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg 48
Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met

ES 2 357 622 T3

1	5	10	15		
gat gtc tat Asp Val Tyr	cag cgc agc Gln Arg Ser	tac tgc cat Tyr Cys His	cca atc gag Pro Ile Glu	acc ctg gtg gac Thr Leu Val Asp	96
atc ttc cag Ile Phe Gln	gag tac cct Glu Tyr Pro	gat gag atc Asp Glu Ile	gag tac atc Glu Tyr Ile	ttc aag cca tcc Phe Lys Pro Ser	144
tgt gtg ccc Cys Val Pro	ctg atg cga Leu Met Arg	tgc tgc ggg Cys Cys Gly	ggc tgc tgc Gly Cys Cys	aat gac gag ggc Asn Asp Glu Gly	192
gag tgt gtg Glu Cys Val	ccc act gag Pro Thr Glu	gag gag tcc Glu Glu Ser	aac atc acc Asn Ile Thr	atg cag att atg Met Gln Ile Met	240
atc aaa cct Ile Lys Pro	cac caa ggc His Gln Gly	cag cac ata Gln His Ile	gga gag atg Gly Glu Met	agc ttc cta cag Ser Phe Leu Gln	288
cac aac aaa His Asn Lys	tgt gaa tgc Cys Glu Cys	aga cca aag Arg Pro Lys	aaa gat aga Lys Asp Arg	gca aga gcc atg Ala Arg Ala Met	336
gca gaa gga Ala Glu Gly	gga gga ggg Gly Gly Gly	cag aat cat Gln Asn His	cac gaa gtg His Glu Val	gtg gtg aag ttc Val Val Lys Phe	384
gtc tat cag Val Tyr Gln	cgc agc tac Arg Ser Tyr	tgc cat cca Cys His Pro	atc gag acc Ile Glu Thr	ctg gtg gac atc Leu Val Asp Ile	432
ttc cag gag Phe Gln Glu	tac tac cct Tyr Tyr Pro	gat gag atc Asp Glu Ile	gag tac atc Glu Tyr Ile	ttc aag cca tcc Phe Lys Pro Ser	480
gtg ccc ctg Val Pro Leu	atg atg cga Met Arg Arg	tgc tgc ggg Cys Cys Gly	ggc tgc tgc Gly Cys Cys	aat gac gag ggc Asn Asp Glu Gly	528
tgt gtg ccc Cys Val Pro	act act gag Thr Thr Glu	gag gag tcc Glu Glu Ser	aac aac atc Asn Ile Ile	acc atg cag att Thr Met Gln Ile	576
aaa cct cac Lys Pro His	caa ggc cag Gln Gly Gln	cac cac ata His His Ile	gga gag atg Gly Glu Met	agc ttc cta cag Ser Phe Leu Gln	624
aac aaa tgt Asn Lys Cys	gaa gaa tgc Glu Cys Arg	aga cca aag Arg Pro Lys	aaa gat aga Lys Asp Arg	gca aga tga Ala Arg *	666

<210> 4

<211> 221

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína factor de crecimiento vascular endotelial de una sola cadena (scVEGF)

10

<400> 4

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met
 1 5 10
 Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
 20 25
 Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser
 35 40 45
 Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu
 50 55 60
 Glu Cys Val Pro Thr Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln
 85 90 95
 His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Ala Met
 100 105 110
 Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp
 115 120 125
 Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile
 130 135 140
 Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys
 145 150 155 160
 Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu
 165 170 175
 Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile
 180 185 190
 Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His
 195 200 205
 Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
 210 215 220

<210> 5

<211> 423

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(423)

10

<223> constructo C4-VEGF121

<400> 5

atg aaa gaa tct tgc gct aaa aaa ttt caa cgt caa cac atg gac tct 48
 Met Lys Glu Ser Cys Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser
 1 5 10
 ggt ggc ggc ggt tcc atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa 96
 Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu
 20 25 30
 gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc 144
 Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile
 35 40 45
 gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac 192
 Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
 50 55 60
 atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc 240
 Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys

65					70					75					80	
aat	gac	gag	ggc	ctg	gag	tgt	gtg	ccc	act	gag	gag	tcc	aac	atc	acc	288
Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	
				85					90					95		
atg	cag	att	atg	cgg	atc	aaa	cct	cac	caa	ggc	cag	cac	ata	gga	gag	336
Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	
			100					105					110			
atg	agc	ttc	cta	cag	cac	aac	aaa	tgt	gaa	tgc	aga	cca	aag	aaa	gat	384
Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	
		115					120					125				
aga	gca	aga	caa	gaa	aaa	tgt	gac	aag	ccg	agg	cgg	tga				423
Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Lys	Cys	Asp	Lys	Pro	Arg	Arg	*				
	130					135					140					

<210> 6

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Humano

<220>

<223> constructo C4-VEGF121

10 <400> 6

Met	Lys	Glu	Ser	Cys	Ala	Lys	Lys	Phe	Gln	Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	
1				5					10					15		
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	
			20					25				30				
Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	
		35					40					45				
Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	
	50					55					60					
Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	
65				70						75				80		
Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	
				85					90					95		
Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	
			100					105					110			
Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	
		115					120					125				
Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Lys	Cys	Asp	Lys	Pro	Arg	Arg					
	130					135					140					

<210> 7

<211> 396

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(396)

<223> constructo C4-VEGF110

<400> 7

```

atg aaa gaa tct tgc gct aaa aaa ttt caa cgt caa cac atg gac tct 48
Met Lys Glu Ser Cys Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser
 1          5          10          15

    ggt ggc ggc ggt tcc atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa 96
    Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu
          20          25          30

    gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc 144
    Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile
          35          40          45

    gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac 192
    Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
          50          55          60

    atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc 240
    Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys
    65          70          75          80

    aat gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc 288
    Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr
          85          90          95

    atg cag att atg cgg atc aaa cct cac caa ggc cag cac ata gga gag 336
    Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
          100          105          110

    atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat 384
    Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
          115          120          125

    aga gca aga tga 396
    Arg Ala Arg *
 130

```

5

<210> 8

<211> 131

<212> PRT

<213> Humano

10

<220>

<223> constructo C4-VEGF110

<400> 8


```

Met Lys Glu Ser Cys Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser
 1  5  10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu
Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile
 35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys
 65  70  75  80  85  90  95  100  105  110  115  120  125
Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr
Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
 100 105 110 115 120 125
Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
 115 120 125
Arg Ala Arg
 130

```

<210> 9

<211> 1056

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo C4(G4S)3-Anexina V

10 <221> CDS

<222> (1)...(1056)

<400> 9

atg Met 1	aaa Lys	gaa Glu	tct Ser	tgc Cys 5	gct Ala	aaa Lys	aaa Lys	ttt Phe	caa Gln 10	cgt Arg	caa Gln	cac His	atg Met	gac Asp 15	tct Ser	48
ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly 20	agt Ser	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly	ggc Gly 25	tca Ser	ggc Gly	gga Gly	ggc Gly	ggc Gly 30	tcc Ser	atg Met	96
gca Ala	cag Gln	gtt Val 35	ctc Leu	aga Arg	ggc Gly	act Thr	gtg Val 40	act Thr	gac Asp	ttc Phe	cct Pro	gga Gly 45	ttt Phe	gat Asp	gag Glu	144
cgg Arg	gct Ala 50	gat Asp	gca Ala	gaa Glu	act Thr	ctt Leu 55	cgg Arg	aag Lys	gct Ala	atg Met	aaa Lys 60	ggc Gly	ttg Leu	ggc Gly	aca Thr	192
gat Asp 65	gag Glu	gag Glu	agc Ser	atc Ile	ctg Leu 70	act Thr	ctg Leu	ttg Leu	aca Thr	tcc Ser 75	cga Arg	agt Ser	aat Asn	gct Ala	cag Gln 80	240
cgc Arg	cag Gln	gaa Glu	atc Ile	tct Ser 85	gca Ala	gct Ala	ttt Phe	aag Lys	act Thr 90	ctg Leu	ttt Phe	ggc Gly	agg Arg	gat Asp 95	ctt Leu	288
ctg Leu	gat Asp	gac Asp	ctg Leu 100	aaa Lys	tca Ser	gaa Glu	cta Leu	act Thr 105	gga Gly	aaa Lys	ttt Phe	gaa Glu 110	aaa Lys 110	tta Leu	att Ile	336
gtg Val	gct Ala	ctg Leu 115	atg Met	aaa Lys	ccc Pro	tct Ser	cgg Arg 120	ctt Leu	tat Tyr	gat Asp	gct Ala	tat Tyr 125	gaa Glu	ctg Leu	aaa Lys	384
cat His	gcc Ala 130	ttg Leu	aag Lys	gga Gly	gct Ala	gga Gly 135	aca Thr	aat Asn	gaa Glu	aaa Lys	gta Val 140	ctg Leu	aca Thr	gaa Glu	att Ile	432
att Ile 145	gct Ala	tca Ser	agg Arg	aca Thr	cct Pro 150	gaa Glu	gaa Glu	ctg Leu	aga Arg	gcc Ala 155	atc Ile	aaa Lys	caa Gln	gtt Val	tat Tyr 160	480
gaa Glu	gaa Glu	gaa Glu	tat Tyr	ggc Gly 165	tca Ser	agc Ser	ctg Leu	gaa Glu	gat Asp 170	gac Asp	gtg Val	gtg Val	ggg Gly	gac Asp 175	act Thr	528
tca Ser	ggg Gly	tac Tyr	tac Tyr 180	cag Gln	cgg Arg	atg Met	ttg Leu	gtg Val 185	ggt Val	ctc Leu	ctt Leu	cag Gln	gct Ala 190	aac Asn	aga Arg	576
gac Asp	cct Pro	gat Asp 195	gct Ala	gga Gly	att Ile	gat Asp	gaa Glu 200	gct Ala	caa Gln	ggt Val	gaa Glu	caa Gln 205	gat Asp	gct Ala	cag Gln	624

gct tta ttt cag gct gga gaa ctt aaa tgg ggg aca gat gaa gaa aag 672
 Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys
 210 215 220

ttt atc acc atc ttt gga aca cga agt gtg tct cat ttg aga aag gtg 720
 Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val
 225 230 235 240

ttt gac aag tac atg act ata tca gga ttt caa att gag gaa acc att 768
 Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile
 245 250 255

gac cgc gag act tct ggc aat tta gag caa cta ctc ctt gct gtt gtg 816
 Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val
 260 265 270

aaa tct att cga agt ata cct gcc tac ctt gca gag acc ctc tat tat 864
 Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr
 275 280 285

gct atg aag gga gct ggg aca gat gat cat acc ctc atc aga gtc atg 912
 Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Met
 290 295 300

gtt tcc agg agt gag att gat ctg ttt aac atc agg aag gag ttt agg 960
 Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys Glu Phe Arg
 305 310 315 320

aag aat ttt gcc acc tct ctt tat tcc atg att aag gga gat aca tct 1008
 Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser
 325 330 335

ggg gac tat aag aaa gct ctt ctg ctg ctc tgt gga gaa gat gac taa 1056
 Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Glu Asp Asp *
 340 345 350

<210> 10

<211> 351

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo C4(G4S)3-Anexina V

10 <400> 10

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

		115						120					125				
His	Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Thr	Glu	Ile		
	130					135					140						
Ile	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys	Gln	Val	Tyr		
145					150					155					160		
Glu	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Val	Val	Gly	Asp	Thr			
				165					170						175		
Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Met	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Asn	Arg		
			180					185					190				
Asp	Pro	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Glu	Gln	Asp	Ala	Gln		
		195					200					205					
Ala	Leu	Phe	Gln	Ala	Gly	Glu	Leu	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Lys		
	210					215					220						
Phe	Ile	Thr	Ile	Phe	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Val		
225					230					235					240		
Phe	Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr	Ile		
				245					250						255		
Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Val		
			260					265					270				
Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala	Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr		
		275					280					285					
Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp	His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met		
	290					295					300						
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe	Arg		
305					310				315						320		
Lys	Asn	Phe	Ala	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser		
				325					330						335		
Gly	Asp	Tyr	Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp			
			340					345					350				

<210> 11

<211> 864

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo C4(G4S)3-LFn

10 <221> CDS

<222> (1)...(864)

<400> 11

atg	aaa	gaa	tct	tgc	gct	aaa	aaa	ttt	caa	cgt	caa	cac	atg	gac	tct	48
Met	Lys	Glu	Ser	Cys	Ala	Lys	Lys	Phe	Gln	Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	
1				5				10						15		
ggt	ggc	ggc	ggt	agt	ggt	ggt	ggc	ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tcc	atg	96
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	
			20				25						30			
gga	gcg	ggc	ggt	cat	ggt	gat	gta	ggt	atg	cac	gta	aaa	gag	aaa	gag	144
Gly	Ala	Gly	Gly	His	Gly	Asp	Val	Gly	Met	His	Val	Lys	Glu	Lys	Glu	
		35				40						45				
aaa	aat	aaa	gat	gag	aat	aag	aga	aaa	gat	gaa	gaa	cga	aat	aaa	aca	192
Lys	Asn	Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Arg	Lys	Asp	Glu	Glu	Arg	Asn	Lys	Thr	
	50					55					60					
cag	gaa	gag	cat	tta	aag	gaa	atc	atg	aaa	cac	att	gta	aaa	ata	gaa	240
Gln	Glu	Glu	His	Leu	Lys	Glu	Ile	Met	Lys	His	Ile	Val	Lys	Ile	Glu	
65				70						75					80	

ES 2 357 622 T3

gta Val	aaa Lys	ggg Gly	gag Glu	gaa Glu 85	gct Ala	gtt Val	aaa Lys	aaa Lys	gag Glu 90	gca Ala	gca Ala	gaa Glu	aag Lys	cta Leu 95	ctt Leu	288
gag Glu	aaa Lys	gta Val	cca Pro 100	tct Ser	gat Asp	gtt Val	tta Leu	gag Glu 105	atg Met	tat Tyr	aaa Lys	gca Ala	att Ile 110	gga Gly	gga Gly	336
aag Lys	ata Ile	tat Tyr 115	att Ile	gtg Val	gat Asp	ggt Gly	gat Asp 120	att Ile	aca Thr	aaa Lys	cat His	ata Ile 125	tct Ser	tta Leu	gaa Glu	384
gca Ala 130	tta Leu	tct Ser	gaa Glu	gat Asp	aag Lys	aaa Lys 135	aaa Lys	ata Ile	aaa Lys	gac Asp	att Ile 140	tat Tyr	ggg Gly	aaa Lys	gat Asp	432
gct Ala 145	tta Leu	tta Leu	cat His	gaa Glu	cat His 150	tat Tyr	gta Val	tat Tyr	gca Ala	aaa Lys 155	gaa Glu	gga Gly	tat Tyr	gaa Glu	ccc Pro 160	480
gta Val	ctt Leu	gta Val	atc Ile	caa Gln 165	tct Ser	tcg Ser	gaa Glu	gat Asp	tat Tyr 170	gta Val	gaa Glu	aat Asn	act Thr	gaa Glu 175	aag Lys	528
gca Ala	ctg Leu	aac Asn	gtt Val 180	tat Tyr	tat Tyr	gaa Glu	ata Ile	ggt Gly 185	aag Lys	ata Ile	tta Leu	tca Ser	agg Arg 190	gat Asp	att Ile	576
tta Leu	agt Ser	aaa Lys 195	att Ile	aat Asn	caa Gln	cca Pro	tat Tyr 200	cag Gln	aaa Lys	ttt Phe	tta Leu	gat Asp 205	gta Val	tta Leu	aat Asn	624
acc Thr	att Ile 210	aaa Lys	aat Asn	gca Ala	tct Ser	gat Asp 215	tca Ser	gat Asp	gga Gly	caa Gln	gat Asp 220	ctt Leu	tta Leu	ttt Phe	act Thr	672
aat Asn 225	cag Gln	ctt Leu	aag Lys	gaa Glu	cat His 230	ccc Pro	aca Thr	gac Asp	ttt Phe	tct Ser 235	gta Val	gaa Glu	ttc Phe	ttg Leu	gaa Glu 240	720
caa Gln	aat Asn	agc Ser	aat Asn	gag Glu 245	gta Val	caa Gln	gaa Glu	gta Val	ttt Phe 250	gcg Ala	aaa Lys	gct Ala	ttt Phe	gca Ala 255	tat Tyr	768
tat Tyr	atc Ile	gag Glu	cca Pro 260	cag Gln	cat His	cgT Arg	gat Asp	gtt Val 265	tta Leu	cag Gln	ctt Leu	tat Tyr	gca Ala 270	ccg Pro	gaa Glu	816
gct Ala	ttt Phe 275	aat Asn	tac Tyr	atg Met	gat Asp	aaa Lys	ttt Phe 280	aac Asn	gaa Glu	caa Gln	gaa Glu	ata Ile 285	aat Asn	cta Leu	tag *	864

<210> 12

<211> 287

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo C4(G4S)3-LFn

10 <400> 12

Met	Lys	Glu	Ser	Cys	Ala	Lys	Lys	Phe	Gln	Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser
1				5					10					15	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Met
			20					25					30		
Gly	Ala	Gly	Gly	His	Gly	Asp	Val	Gly	Met	His	Val	Lys	Glu	Lys	Glu
		35					40					45			
Lys	Asn	Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Arg	Lys	Asp	Glu	Glu	Arg	Asn	Lys	Thr
	50					55				60					
Gln	Glu	Glu	His	Leu	Lys	Glu	Ile	Met	Lys	His	Ile	Val	Lys	Ile	Glu
65				70					75						80
Val	Lys	Gly	Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu
			85						90					95	
Glu	Lys	Val	Pro	Ser	Asp	Val	Leu	Glu	Met	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gly	Gly
			100					105					110		
Lys	Ile	Tyr	Ile	Val	Asp	Gly	Asp	Ile	Thr	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Glu
	115						120					125			
Ala	Leu	Ser	Glu	Asp	Lys	Lys	Lys	Ile	Lys	Asp	Ile	Tyr	Gly	Lys	Asp
	130					135					140				
Ala	Leu	Leu	His	Glu	His	Tyr	Val	Tyr	Ala	Lys	Glu	Gly	Tyr	Glu	Pro
145				150					155						160
Val	Leu	Val	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu	Asp	Tyr	Val	Glu	Asn	Thr	Glu	Lys
			165						170					175	
Ala	Leu	Asn	Val	Tyr	Tyr	Glu	Ile	Gly	Lys	Ile	Leu	Ser	Arg	Asp	Ile
			180					185					190		
Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Gln	Pro	Tyr	Gln	Lys	Phe	Leu	Asp	Val	Leu	Asn
		195					200					205			
Thr	Ile	Lys	Asn	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Gly	Gln	Asp	Leu	Leu	Phe	Thr
	210					215					220				
Asn	Gln	Leu	Lys	Glu	His	Pro	Thr	Asp	Phe	Ser	Val	Glu	Phe	Leu	Glu
	225				230					235					240
Gln	Asn	Ser	Asn	Glu	Val	Gln	Glu	Val	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Ala	Tyr
			245						250					255	
Tyr	Ile	Glu	Pro	Gln	His	Arg	Asp	Val	Leu	Gln	Leu	Tyr	Ala	Pro	Glu
			260					265					270		
Ala	Phe	Asn	Tyr	Met	Asp	Lys	Phe	Asn	Glu	Gln	Glu	Ile	Asn	Leu	
		275					280					285			

<210> 13

<211> 729

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo C4(G4S)SCVEGF

10 <221> CDS

<222> (1)...(729)

<400> 13

ES 2 357 622 T3

atg aaa gaa tct tgc gct aaa aaa ttt caa cgt caa cac atg gac tct 48
Met Lys Glu Ser Cys Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser
1 5 10 15

ggc ggc ggc ggt tcc atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa 96
Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu
20 25 30

gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc 144
Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile
35 40 45

gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac 192

Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
50 55 60

atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggc ggc tgc tgc 240
Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys
65 70 75 80

aat gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc 288
Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr
85 90 95

atg cag att atg cgg atc aaa cct cac caa ggc cag cac ata gga gag 336
Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
100 105 110

atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat 384
Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
115 120 125

aga gca aga gcc atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa gtg 432
Arg Ala Arg Ala Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val
130 135 140

gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc gag 480
Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu
145 150 155 160

acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac atc 528
Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile
165 170 175

ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggc ggc tgc tgc aat 576
Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
180 185 190

gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc atg 624
Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met
195 200 205

cag att atg cgg atc aaa cct cac caa ggc cag cac ata gga gag atg 672
Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met
210 215 220

agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat aga 720
Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg
225 230 235 240

gca aga tga
Ala Arg * 729

<210> 14

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo C4(G4S)scVEGF

<400> 14

5

```

Met Lys Glu Ser Cys Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser
 1      5      10      15
Gly Gly Gly Gly Ser Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu
Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile
 20 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80
Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
 65 70 75 80 85 90 95
Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys
Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr
 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160
Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Arg Ala Arg Ala Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val
 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu
 145 150 155 160 165 170 175
Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile
 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220
Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240
Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met
 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240
Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met
 210 215 220 225 230 235 240
Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg
 225 230 235 240
Ala Arg
    
```

<210> 15

<211> 324

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hus(C118)

15 <221> CDS

<222> (1)...(324)

<400> 15

ES 2 357 622 T3

```

agc agc tcc aac tac tgc aac cag atg atg cgt cgt cgt aac atg acc 48
Ser Ser Ser Asn Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr
 1          5          10
caa ggt cgt tgc aaa ccg gtg aac act ttc gtt cat gaa ccg ctt gta 96
Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val
          20          25          30
gac gtt cag aac gtt tgc ttc caa gag aag gtt acc tgc aaa aat ggc 144
Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly
          35          40          45
cag ggt aac tgc tac aaa tct aac tct tct atg cat atc act gac tgc 192
Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys
          50          55          60
cgt ctt act aac gga tcc cgt tac ccc aac tgc gct tac cgt act tct 240
Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser
 65          70          75          80

cct aag gaa cgt cat atc atc gtt gca tgc gaa ggc tct ccg tac gtt 288
Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val
          85          90          95

ccg tgt cat ttc gac gcg tct gtt gaa gac tct tga 324
Pro Cys His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser *
          100          105

```

<210> 16

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HuS(CC118)

10

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 324

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HuS(C88, C118)

<221> CDS

5 <222> (1)...(324)

<400> 17

```

agc agc tcc aac tac tgc aac cag atg atg cgt cgt cgt aac atg acc 48
Ser Ser Ser Asn Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr
 1                               5                               10                               15

caa ggt cgt tgc aaa ccg gtg aac act ttc gtt cat gaa ccg ctt gta 96
Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val
                               20                               25                               30

gac gtt cag aac gtt tgc ttc caa gag aag gtt acc tgc aaa aat ggc 144
Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly
                               35                               40                               45

cag ggt aac tgc tac aaa tct aac tct tct atg cat atc act gac tgc 192
Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys
 50                               55                               60

cgt ctt act tgc gga tcc cgt tac ccc aac tgc gct tac cgt act tct 240
Arg Leu Thr Cys Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser
65                               70                               75                               80

cct aag gaa cgt cat atc atc gtt gca tgc gaa ggc tct ccg tac gtt 288
Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val
                               85                               90                               95

ccg tgt cat ttc gac gcg tct gtt gaa gac tct tga 324
Pro Cys His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser *
                               100                               105

```

<210> 18

10 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> HuS(C88, C118)

<400> 18

Ser Ser Sér Asn Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr
 1 Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr 10 Phe Val His Glu Pro Leu Val
 20 Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly
 35 Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys
 50 Arg Leu Thr Cys Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser
 65 Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val
 80 Pro Cys His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser
 100 105

<210> 19

<211> 387

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BHR(A8, P11, C118)

10 <221> CDS

<222> (1)...(387)

<400> 19

ES 2 357 622 T3

atg aag gaa act gca gca gcc aag gct gag cgg ccg cac atg gac tcc 48
 Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Ala Glu Arg Pro His Met Asp Ser
 1 5 10 15

agc act tcc gct gcc agc agc tcc aac tac tgc aac cag atg atg cgt 96
 Ser Thr Ser Ala Ala Ser Ser Ser Asn Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg
 20 25 30

cgt cgt aac atg acc caa ggt cgt tgc aaa ccg gtg aac act ttc gtt 144
 Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val
 35 40 45

cat gaa ccg ctt gta gac gtt cag aac gtt tgc ttc caa gag aag gtt 192

His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val
 50 55 60

acc tgc aaa aat ggc cag ggt aac tgc tac aaa tct aac tct tct atg 240
 Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met
 65 70 75 80

cat atc act gac tgc cgt ctt act aac gga tcc cgt tac ccc aac tgc 288
 His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys
 85 90 95

gct tac cgt act tct cct aag gaa cgt cat atc atc gtt gca tgc gaa 336
 Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu
 100 105 110

ggc tct ccg tac gtt ccg tgt cat ttc gac gcg tct gtt gaa gac tct 384
 Gly Ser Pro Tyr Val Pro Cys His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser
 115 120 125

tga 387
 *

<210> 20

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BHR(A8, P11, C118)

10 <400> 20

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

<210> 21
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> BHR(A8, P11, C88, C118)

<221> CDS

10 <222> (1)...(387)

<400> 21

tg aag gaa act gca gca gcc aag gct gag cgg ccg cac atg gac tcc	48
Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Ala Glu Arg Pro His Met Asp Ser	
1 5 10 15	
gc act tcc gct gcc agc agc tcc aac tac tgc aac cag atg atg cgt	96
Ier Thr Ser Ala Ala Ser Ser Ser Asn Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg	
20 25 30	
gt cgt aac atg acc caa ggt cgt tgc aaa ccg gtg aac act ttc gtt	144
Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val	
35 40 45	
cat gaa ccg ctt gta gac gtt cag aac gtt tgc ttc caa gag aag gtt	192
His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val	
50 55 60	
acc tgc aaa aat ggc cag ggt aac tgc tac aaa tct aac tct tct atg	240
Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met	
65 70 75 80	
cat atc act gac tgc cgt ctt act tgc gga tcc cgt tac ccc aac tgc	288
His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Cys Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys	
85 90 95	
gct tac cgt act tct cct aag gaa cgt cat atc atc gtt gca tgc gaa	336
Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu	
100 105 110	
ggc tct ccg tac gtt ccg tgt cat ttc gac gcg tct gtt gaa gac tct	384
Gly Ser Pro Tyr Val Pro Cys His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser	
115 120 125	
tga	387
*	

<210> 22
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> BHR(A8, P11, C88, C118)

20

<400> 22

```

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

<210> 23

<211> 36

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

10

<400> 23

tatacatat gaaagaatct tgcgctaaaa aatttc 36

<210> 24

15 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de cebador

<400> 24

agattcttc atatgtatat ctcttctta aagtt 35

25 <210> 25

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 25

5 ggataacaat tcccctctag aaataattt gttaac 37

<210> 26

<211> 34

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

15 <400> 26

actacccatg gaaccgccgc caccagagtc catg 34

<210> 27

<211> 32

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

25

<400> 27

cacaagccat ggcacccatg gcagaaggag ga 32

<210> 28

30 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de cebador

<400> 28

actaccatg gtcaccgct cggcttgca c 31

<210> 29

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

10

<400> 29

ctgctccatg ggagcgggcg gtcattgtga tg 32

<210> 30

15 <211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia de cebador

<400> 30

actaccatg gctatagatt tatttctgt tcgttaaatt tacc 44

25 <210> 31

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 31

cacaagccat ggacagggt ctacagag 27

35

<210> 32

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de cebador

<400> 32

actaccatg gtagtcac ttctccacag agc 33

10 <210> 33

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 33

cacggatccg gtggcggcgg tagtggt 27

20

<210> 34

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 34

30 cacggatcct catcttgctc tatcttctt tggctgctc 38

<210> 35

<211> 32

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 35

cacaagccat ggcacccatg gcagaaggag ga 32

5

<210> 36

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 36

15 actacccatg gctcttgctc tatcttctt tggctctgc 38

<210> 37

<211> 35

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

25 <400> 37

aaggctctcc gtacgttccg tgcatttcg acgcg 35

<210> 38

<211> 30

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

35

<400> 38

cggaacgtac ggagagcctt cgcattgcaac 30

<210> 39
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador

 10 <400> 39
 tcactgactg ccgtcttact tgcggatccc gtt 33

 <210> 40
 <211> 31
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de cebador
 20
 <400> 40
 agtaagacgg cagtcagtga tatgcataga a 31

 <210> 41
 25 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Secuencia de cebador

 <400> 41
 gcagccaagt ttgagcggcc gcacatggac tc 32

 35 <210> 42
 <211> 31
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador

5

<400> 42

gccgctcaaa ctggctgct gcagttcct t 31

<210> 43

10

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Secuencia de cebador

<400> 43

ggaaactgca gcagccaagg ctgagcgcc gc 32

20

<210> 44

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 44

ctggctgct gcagttcct tcatatgat at 32

30

<210> 45

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 45

aaaaacatat gaaggaattt accttagact tctcg 35

5 <210> 46

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de cebador

<400> 46

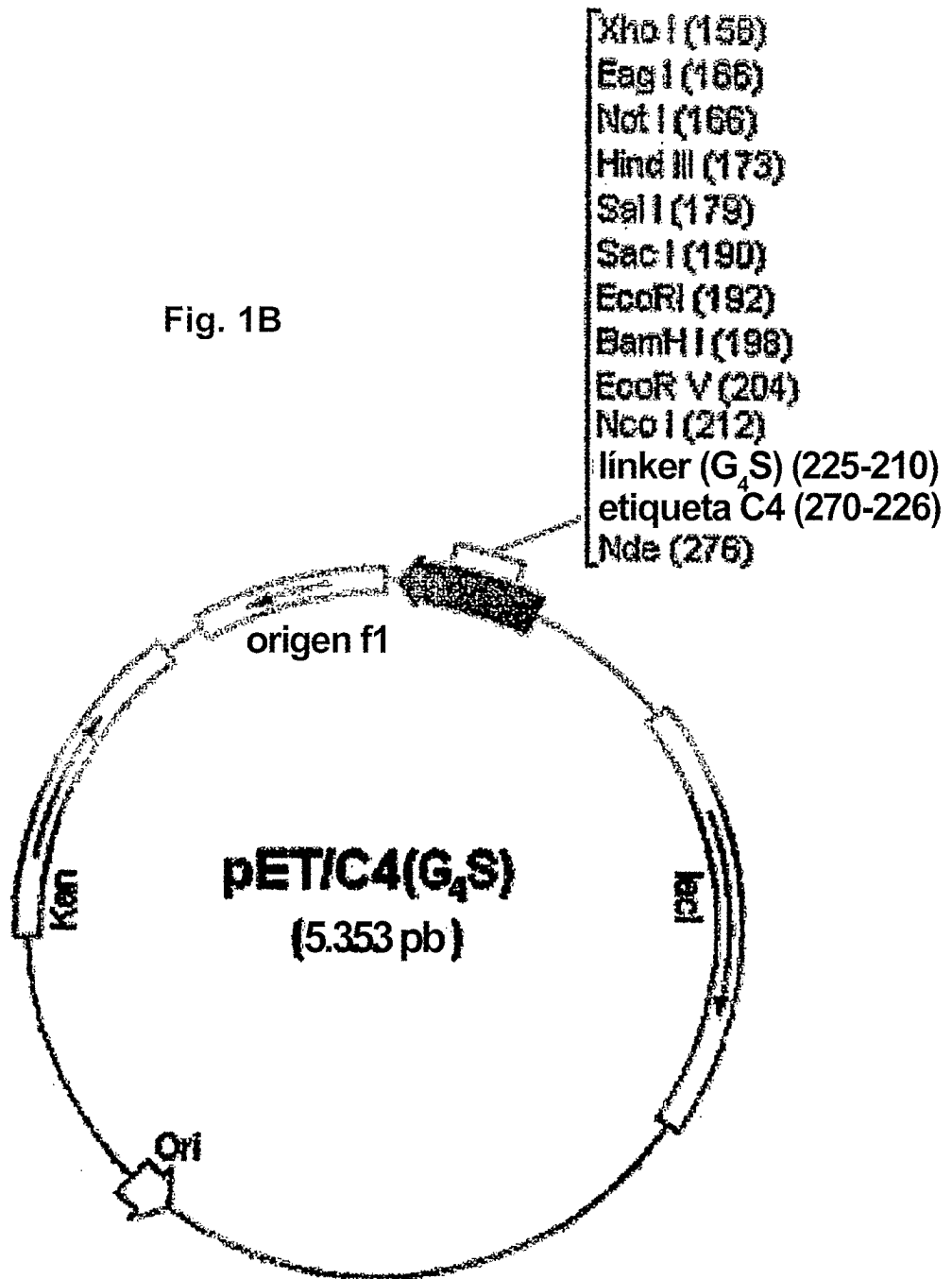
tactcgagtc accgctcgg ctgtcac 28

15

REIVINDICACIONES

1. Conjugado biológico, que comprende:
 - (a) un grupo de direccionamiento que comprende un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácido que comprende la secuencia polipeptídica SEC ID nº 2 y la secuencia polipeptídica de una proteína de direccionamiento seleccionada, y
 - (b) un grupo de unión,
 presentando dicho conjugado biológico un enlace covalente entre el grupo tiol de SEC ID nº 2 y un grupo funcional en dicho grupo de unión.
2. Conjugado biológico según la reivindicación 1, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende VEGF humano, o una forma mutada o truncada del mismo.
3. Conjugado biológico según la reivindicación 2, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende la secuencia SEC ID nº 6 ó SEC ID nº 8.
4. Conjugado biológico según la reivindicación 1, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende anexina V humana, o una forma mutada o truncada de la misma.
5. Conjugado biológico según la reivindicación 4, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende la secuencia SEC ID nº 10.
6. Conjugado biológico según la reivindicación 1, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende un fragmento catalíticamente inactivo del factor letal del ántrax, o una forma mutada o truncada del mismo.
7. Conjugado biológico según la reivindicación 6, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende la secuencia SEC ID nº 12.
8. Conjugado biológico según la reivindicación 1, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende scVEGF que presenta la secuencia proteica SEC ID nº 4.
9. Conjugado biológico según la reivindicación 8, en el que dicha proteína de direccionamiento comprende la secuencia SEC ID nº 14.
10. Conjugado biológico según la reivindicación 1, en el que dicho grupo de unión se selecciona de entre fármacos, radionucleidos quelantes, polietilenglicol, pigmentos, lípidos, liposomas y superficies seleccionadas.
11. Conjugado biológico según la reivindicación 10, en el que dichas superficies seleccionadas se seleccionan de entre la superficie de una nanopartícula o micropartícula, la superficie de un dendrímero, la superficie de un andamiaje de tejidos, la superficie de un dispositivo biomédico y la superficie de un biosensor.
12. Conjugado biológico según la reivindicación 1, en el que dicho grupo de unión comprende una proteína adaptadora complementaria.
13. Conjugado biológico según la reivindicación 12, en el que dicha proteína adaptadora es la ARNasa I humana mutante que comprende Cys18, o un fragmento de la misma.
14. Conjugado biológico según la reivindicación 13, en el que dicha proteína adaptadora presenta una secuencia polipeptídica seleccionada de entre SEC ID nº 16, SEC ID nº 18, SEC ID nº 20 y SEC ID nº 22.
15. Composición farmacéutica para administrar selectivamente una entidad seleccionada en una diana en un paciente, que comprende:
 - (a) un portador farmacéuticamente aceptable, y
 - (b) el conjugado biológico según la reivindicación 1.

Fig. 1B



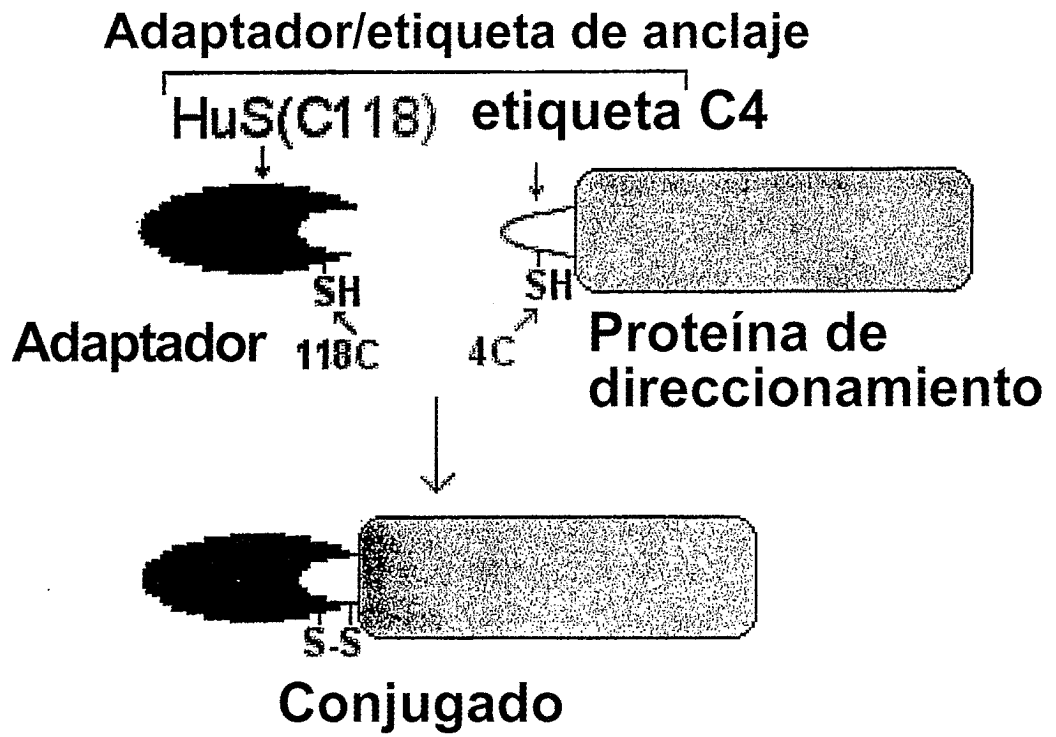


Fig. 2A

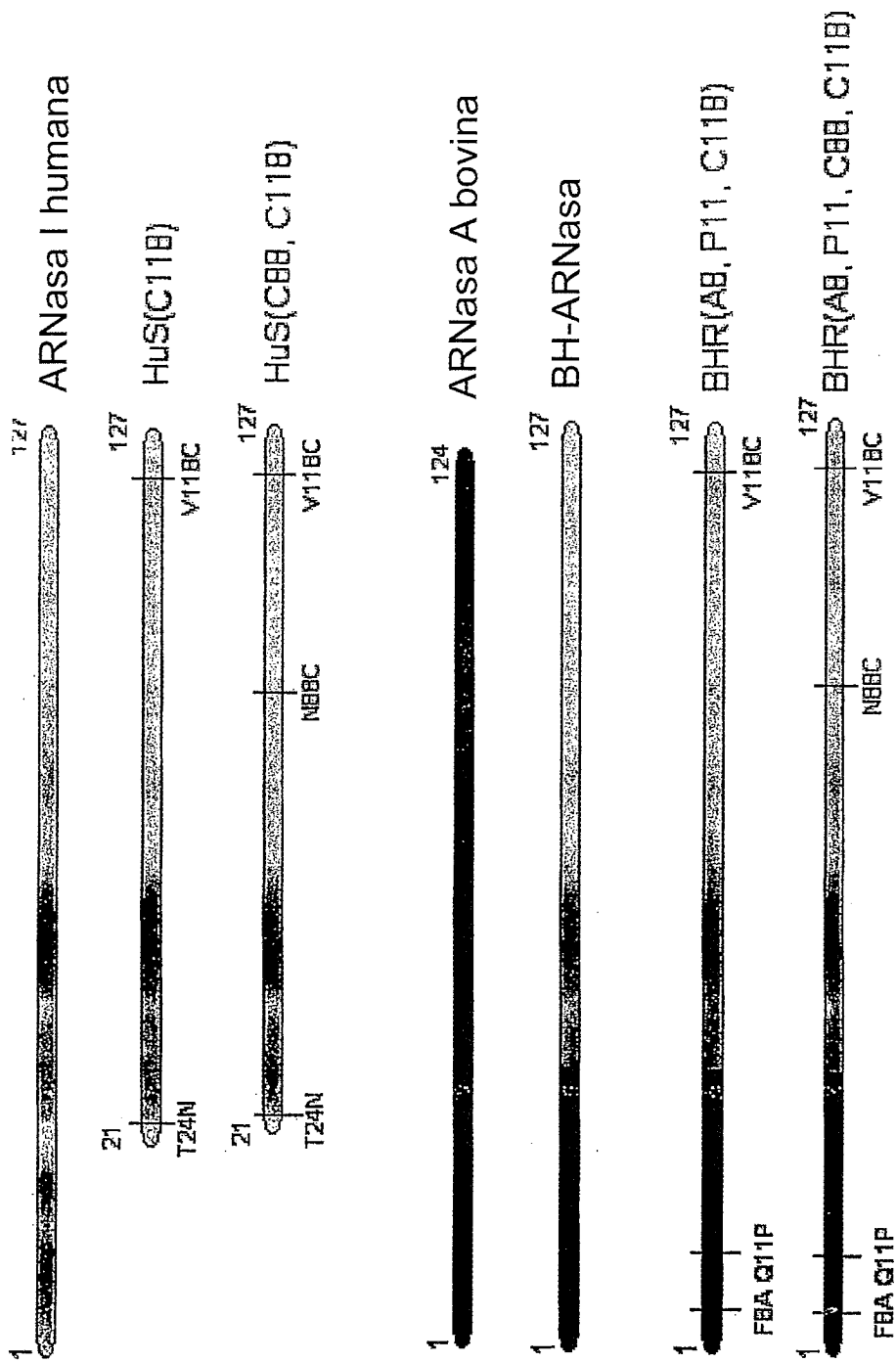
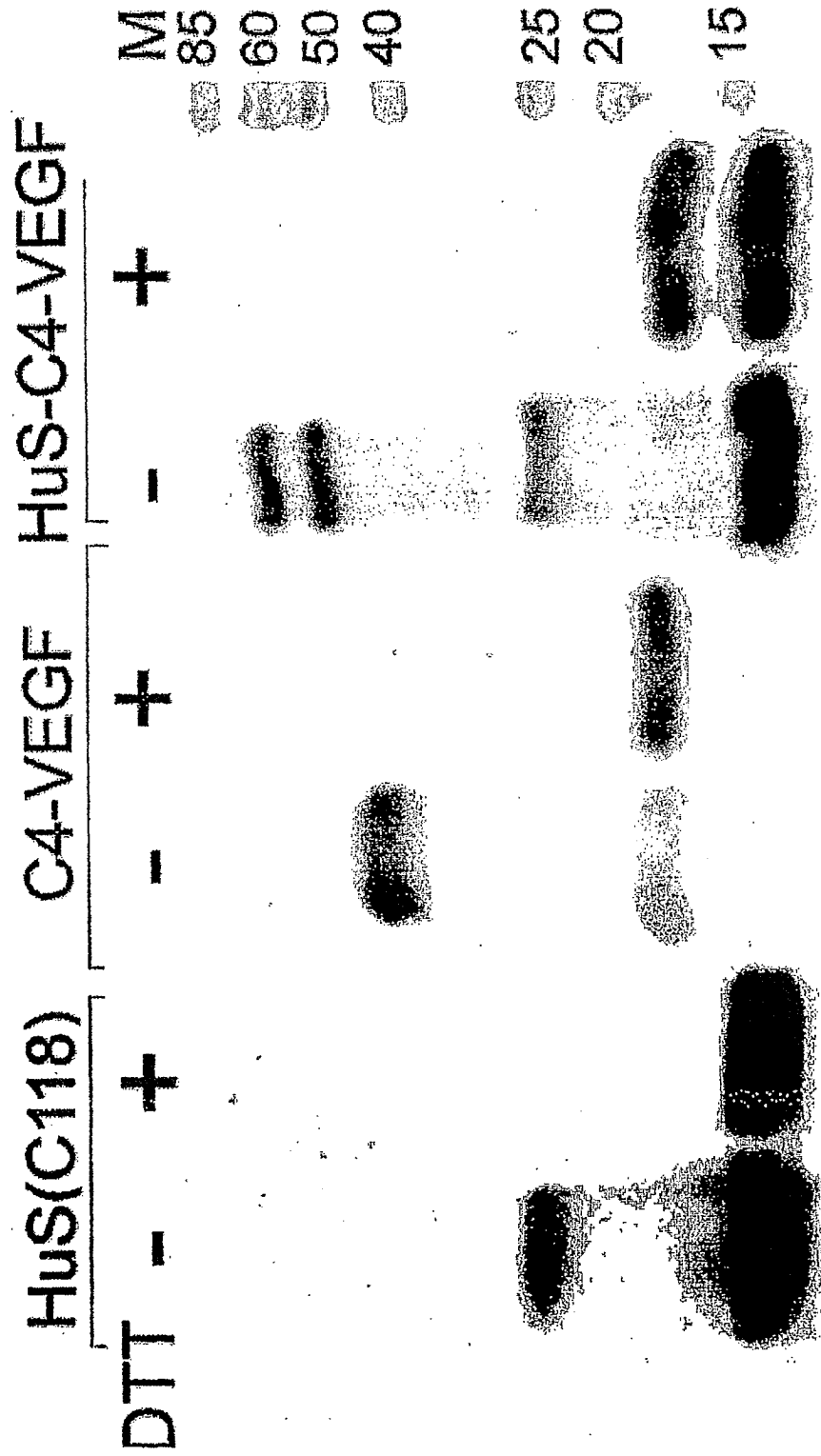


Fig. 2B

Fig. 2C



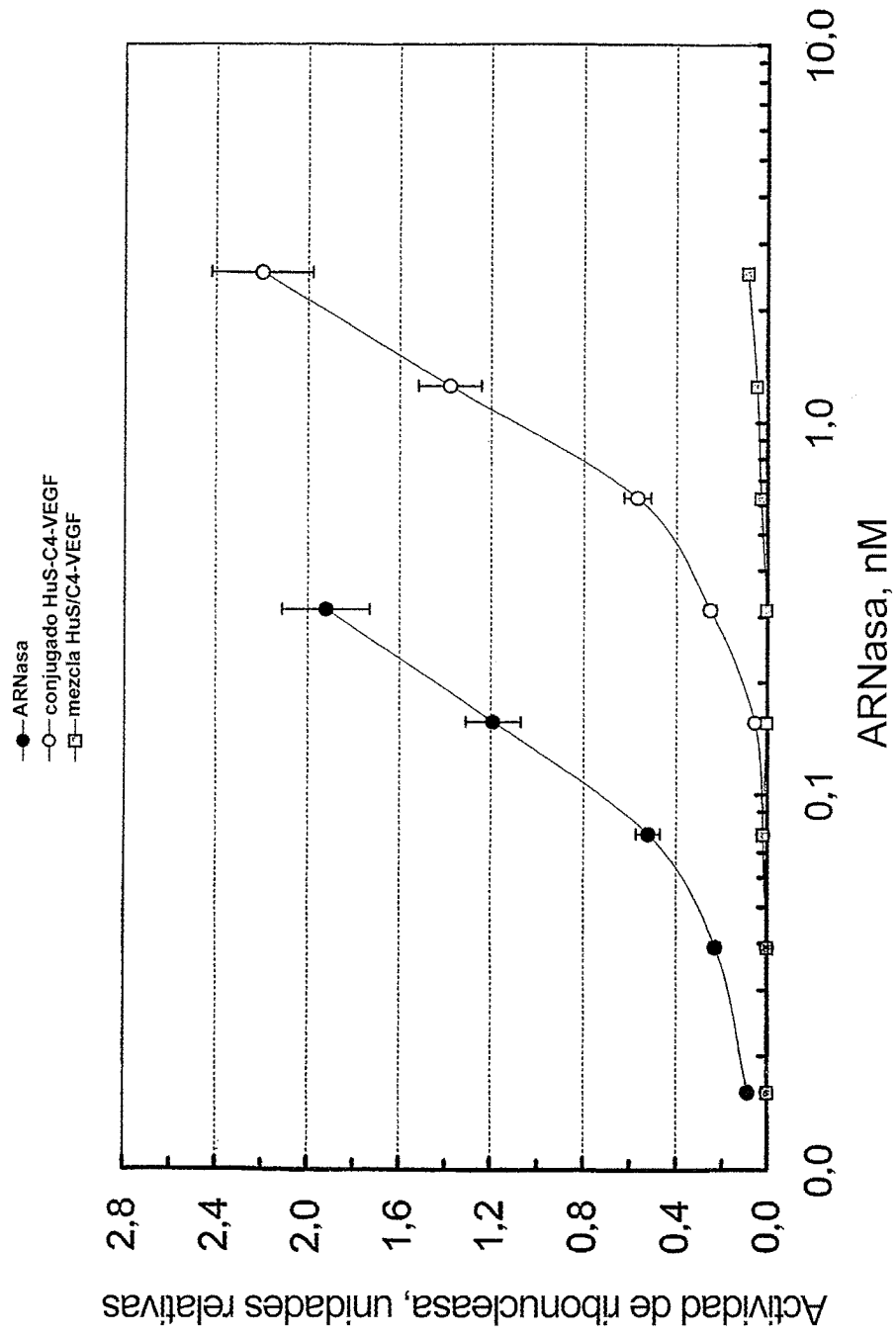
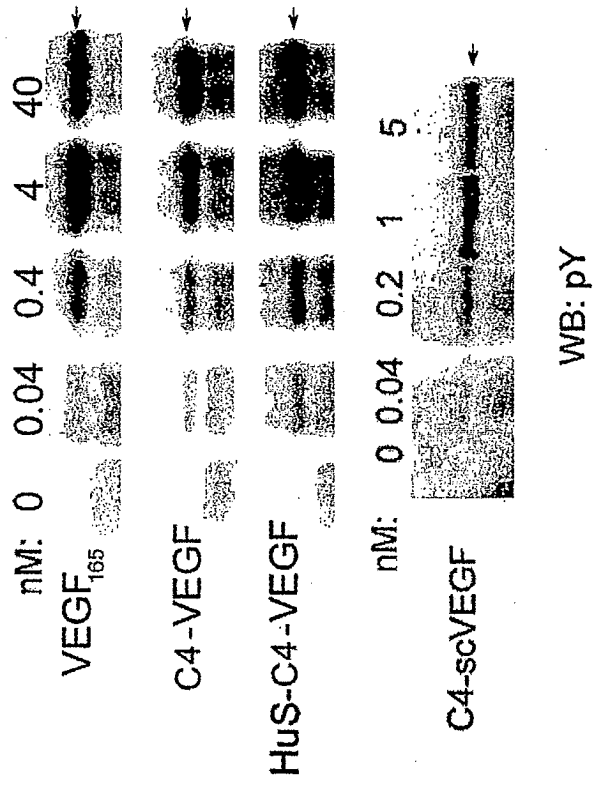


Fig. 2D

Fig. 3A C4-scVEGF



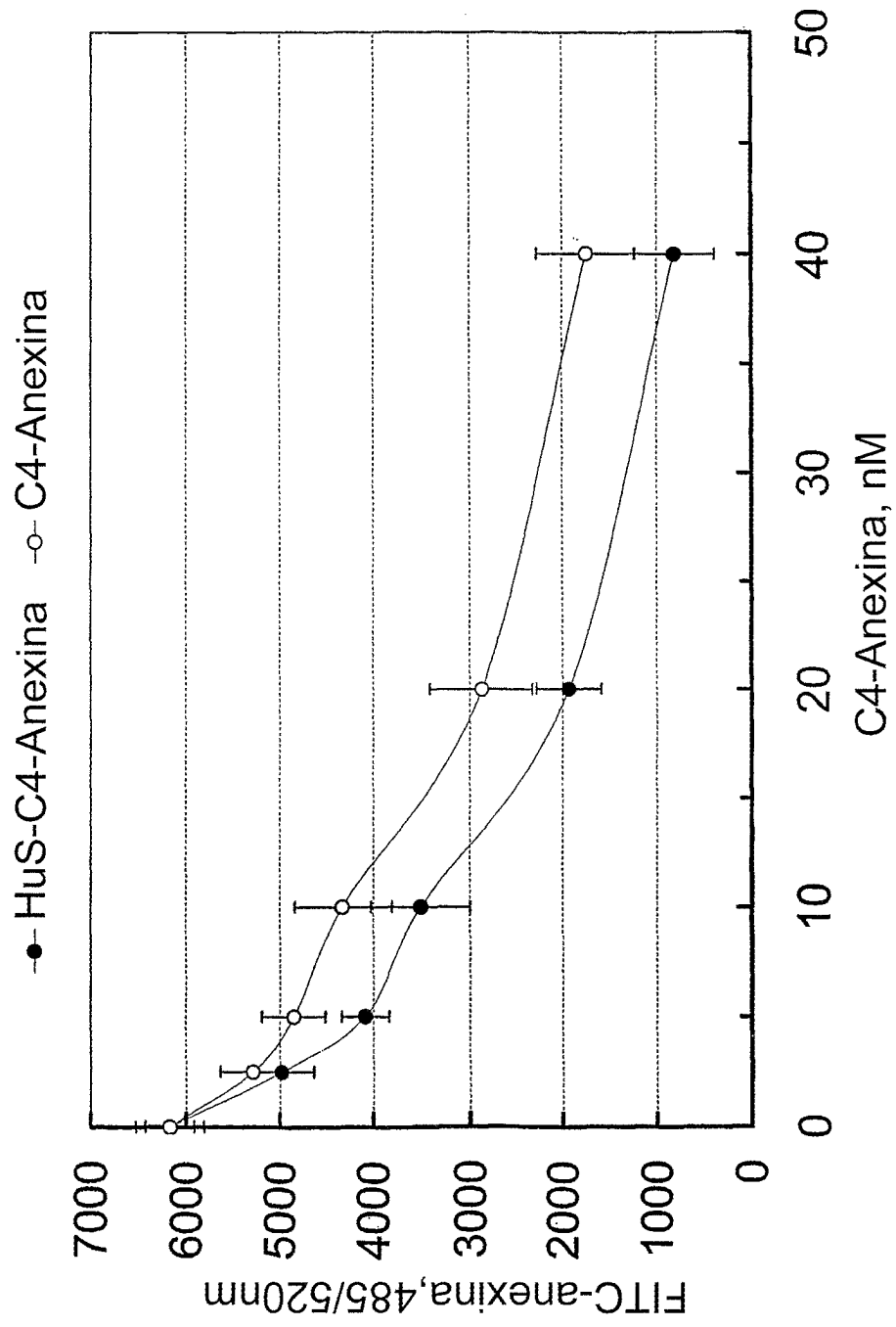


Fig. 3B

Fig 3C

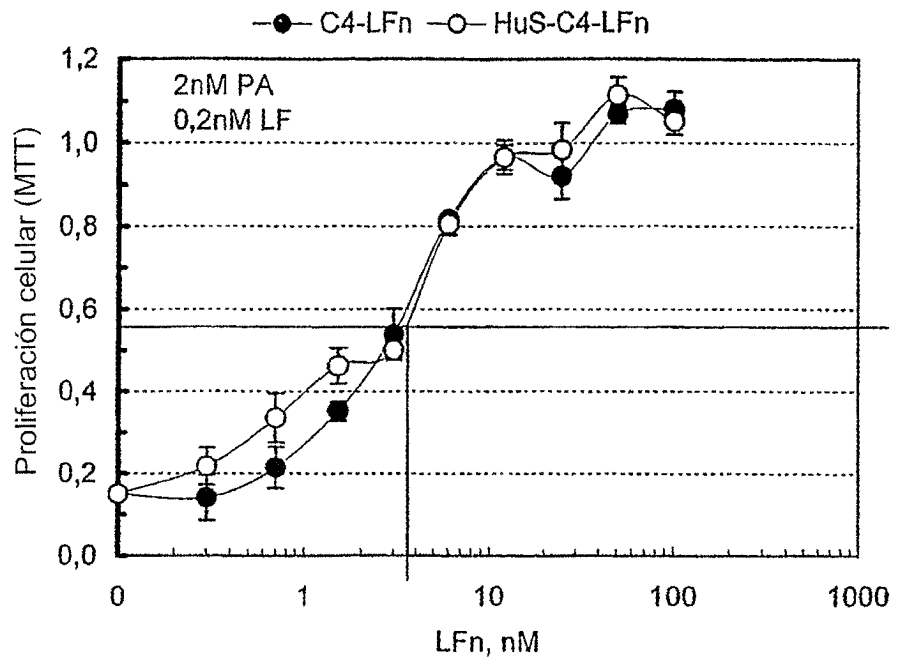


Fig. 4A HYNIC-C4-scVEGF

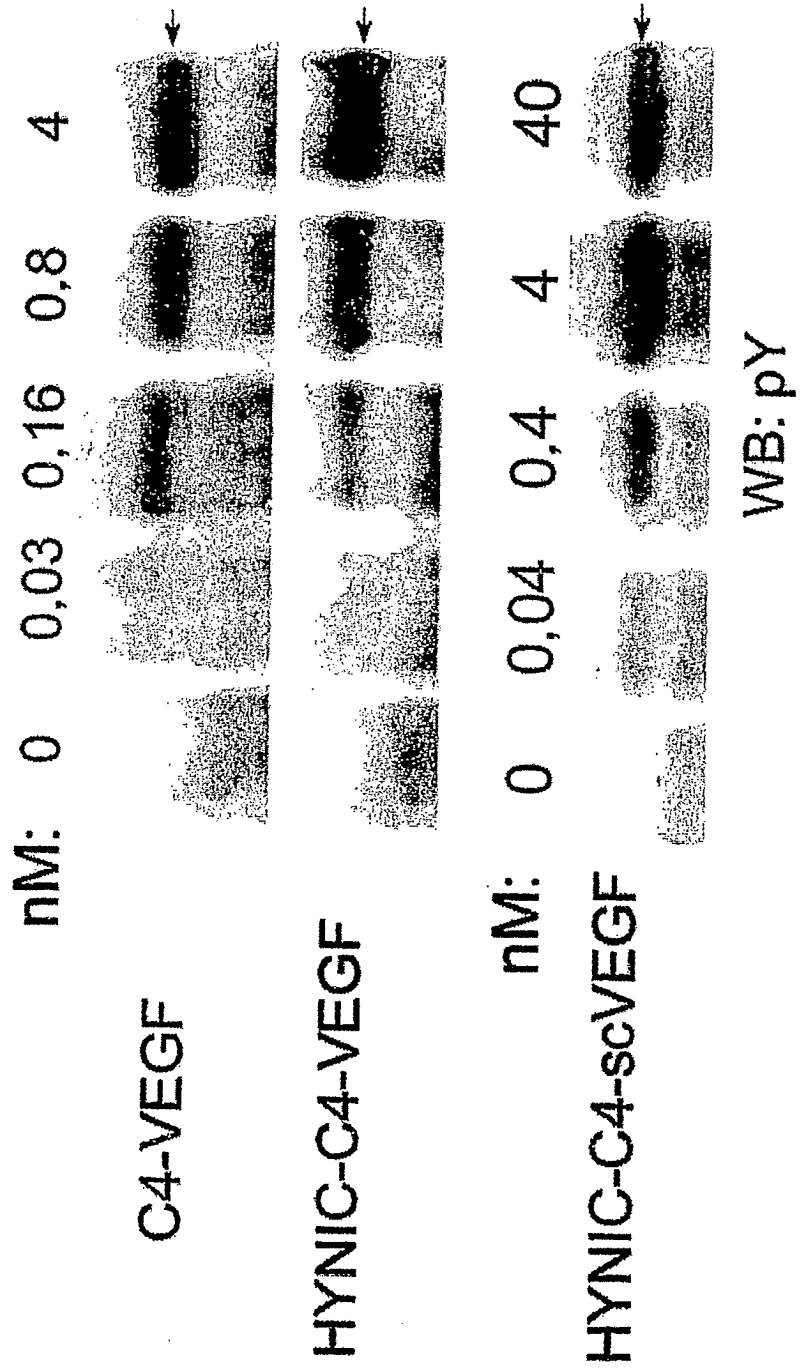


Fig. 4B HYNIC-C4-scVEGF

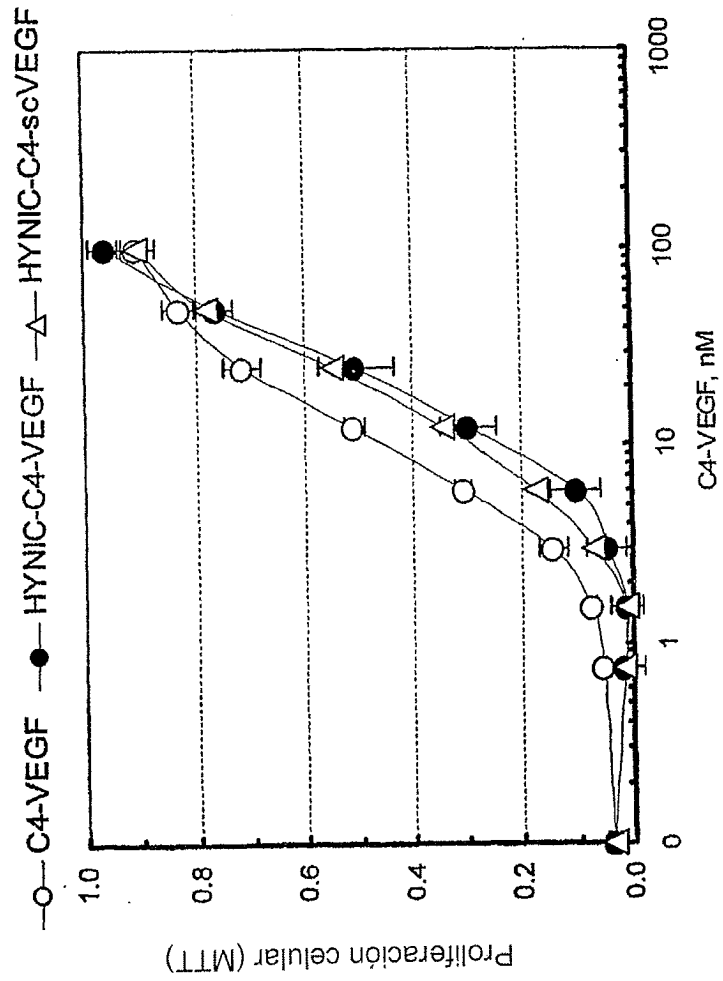


Figura 5A

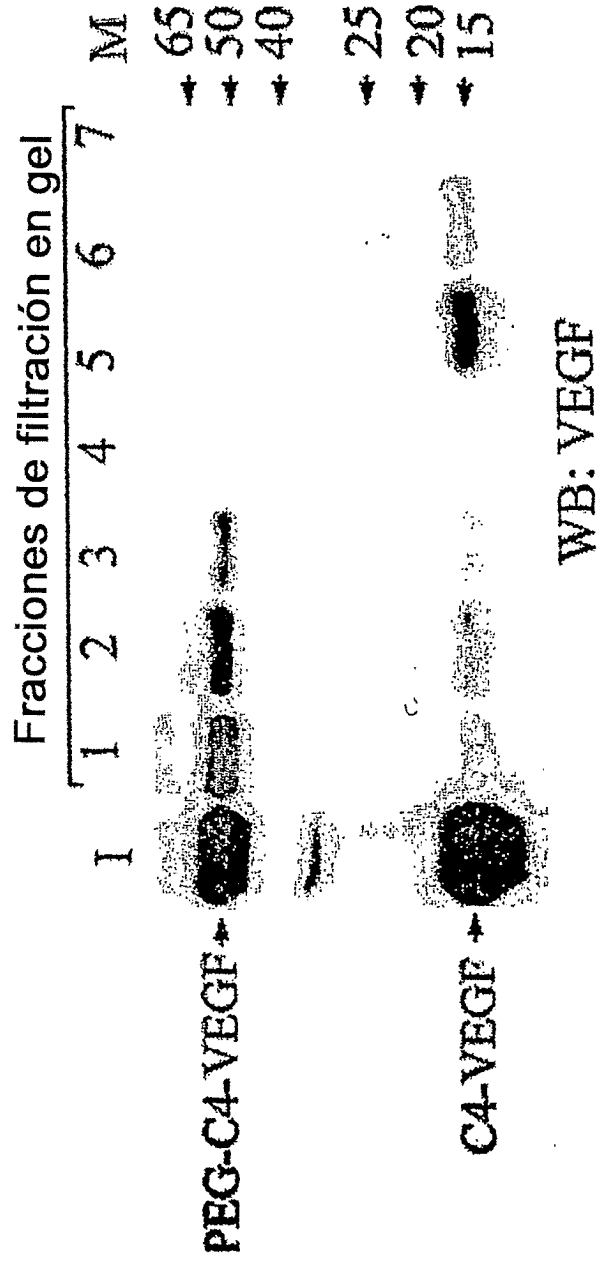


Fig. 5B

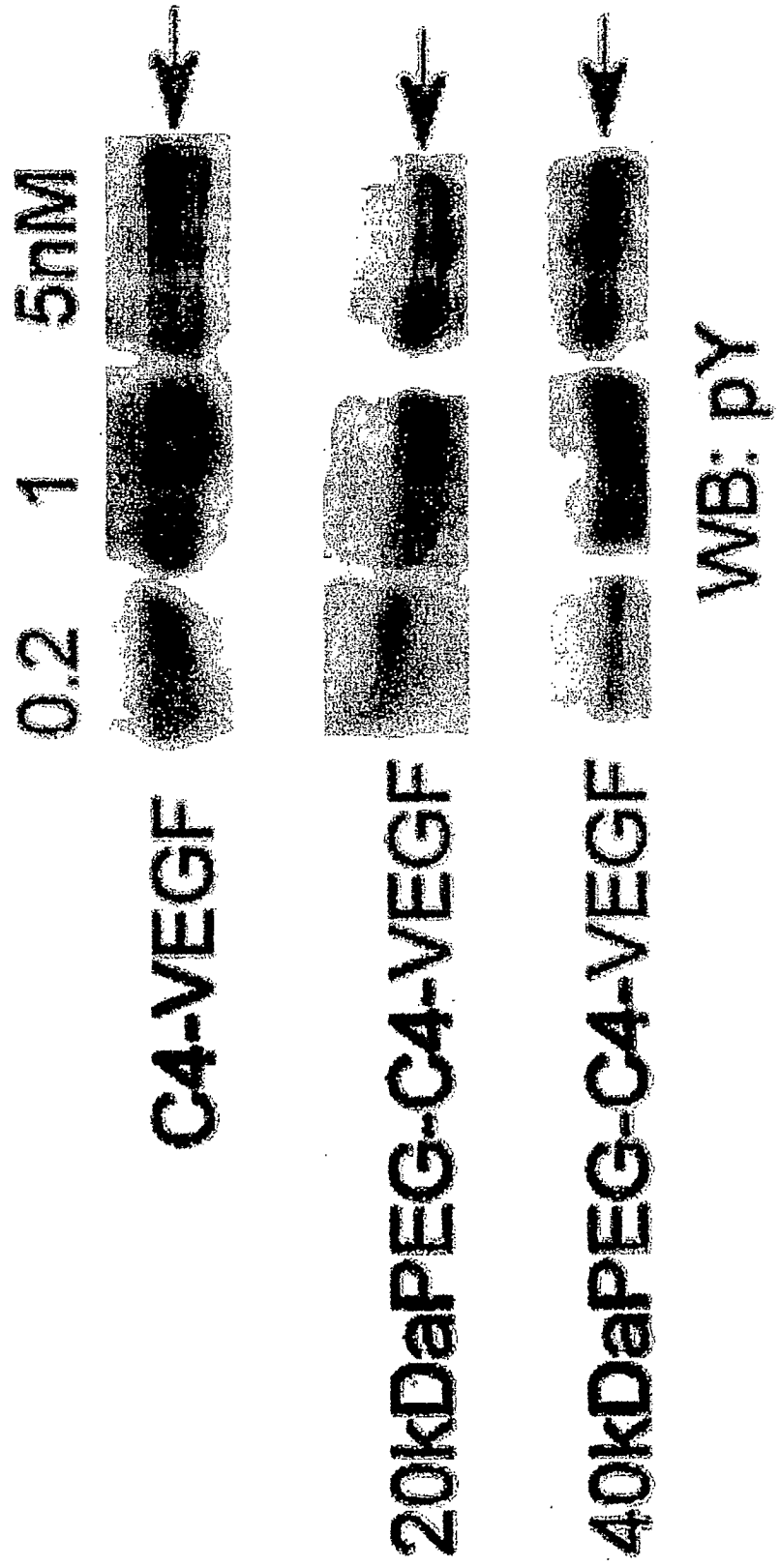


Figura 6A

Desprotección de BH-ARNasa(C88, C118)

↓ 1mM DTT, 0,5 NDSB, 16 horas a 4°C

Digestión con subtilisina de BH-ARNasa(C88, C118) desprotegida

↓ Proporción p/p de subtilisina a BH-ARNasa(C88, C118) de 1:10, 15 minutos a 4°C

Fraccionamiento en columna SP de intercambio catiónico

↓ Se separa la subtilisina de la proteína digerida

Conjugación con C4-VEGF

↓ Proporción molar 1:3 de C4-VEGF a HuS(C88, C118)
16 horas a 4°C

Modificación con Cy5.5

↓ Proporción molar 4:1 de Cy5.5-maleimida a
HuS(C88, C118); 1 hora a temperatura ambiente

Purificación de Cy5.5-HuS-C4-VEGF

↓ desalado para eliminar Cy5.5 no reaccionado
purificación mediante RP-HPLC de Cy5.5-HuS-C4-VEGF en
columna C4
Intercambio de tampón en columna SP de intercambio
catiónico

Análisis de HPLC de Cy5.5-HuS-C4-VEGF purificado

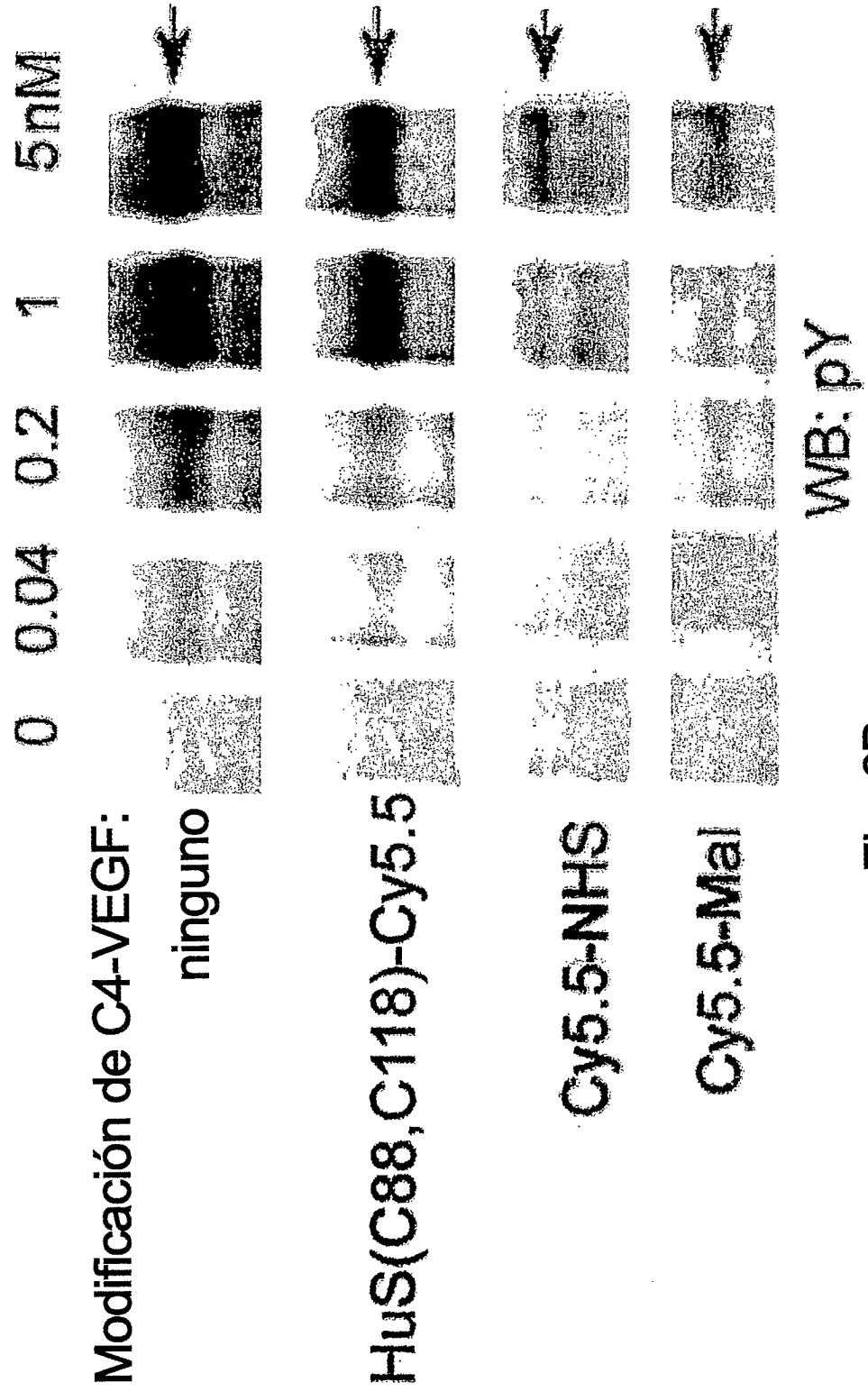


Fig. 6B

Fig 6C

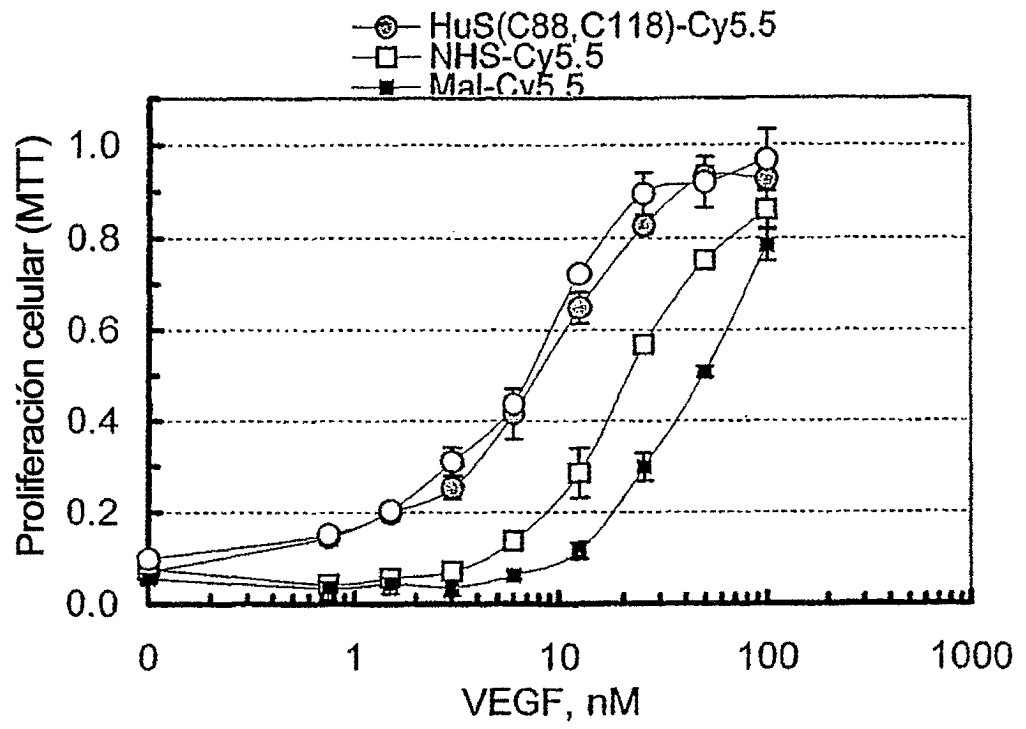
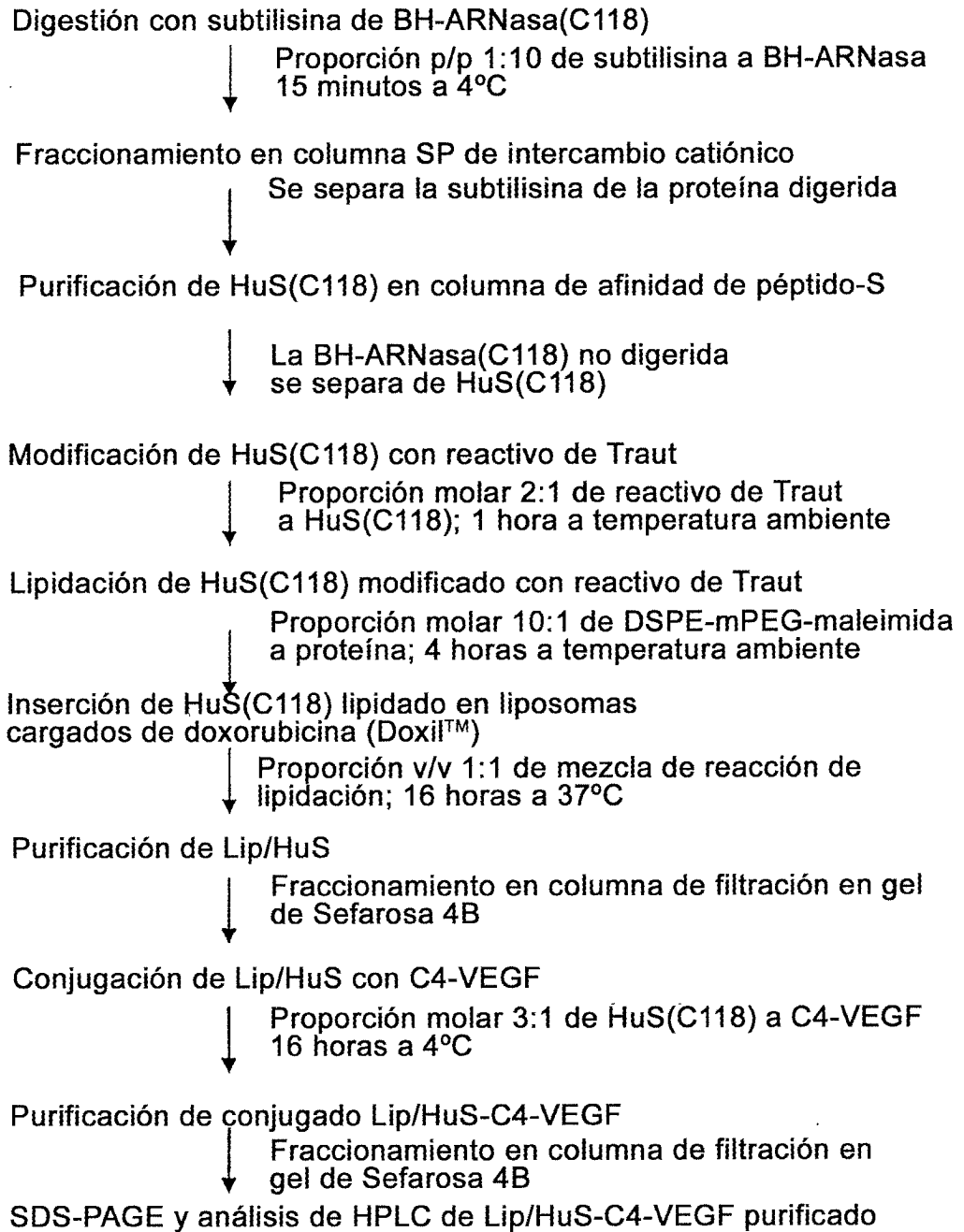


Figura 7A



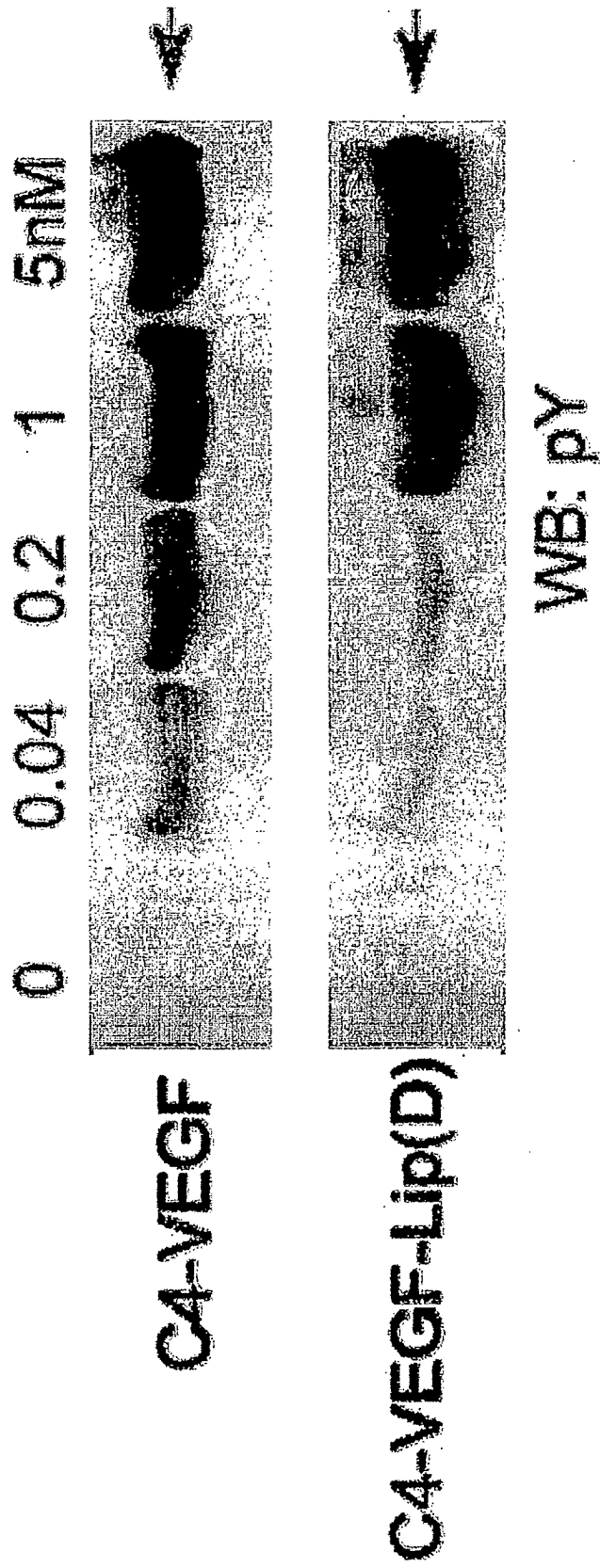


Fig. 7B

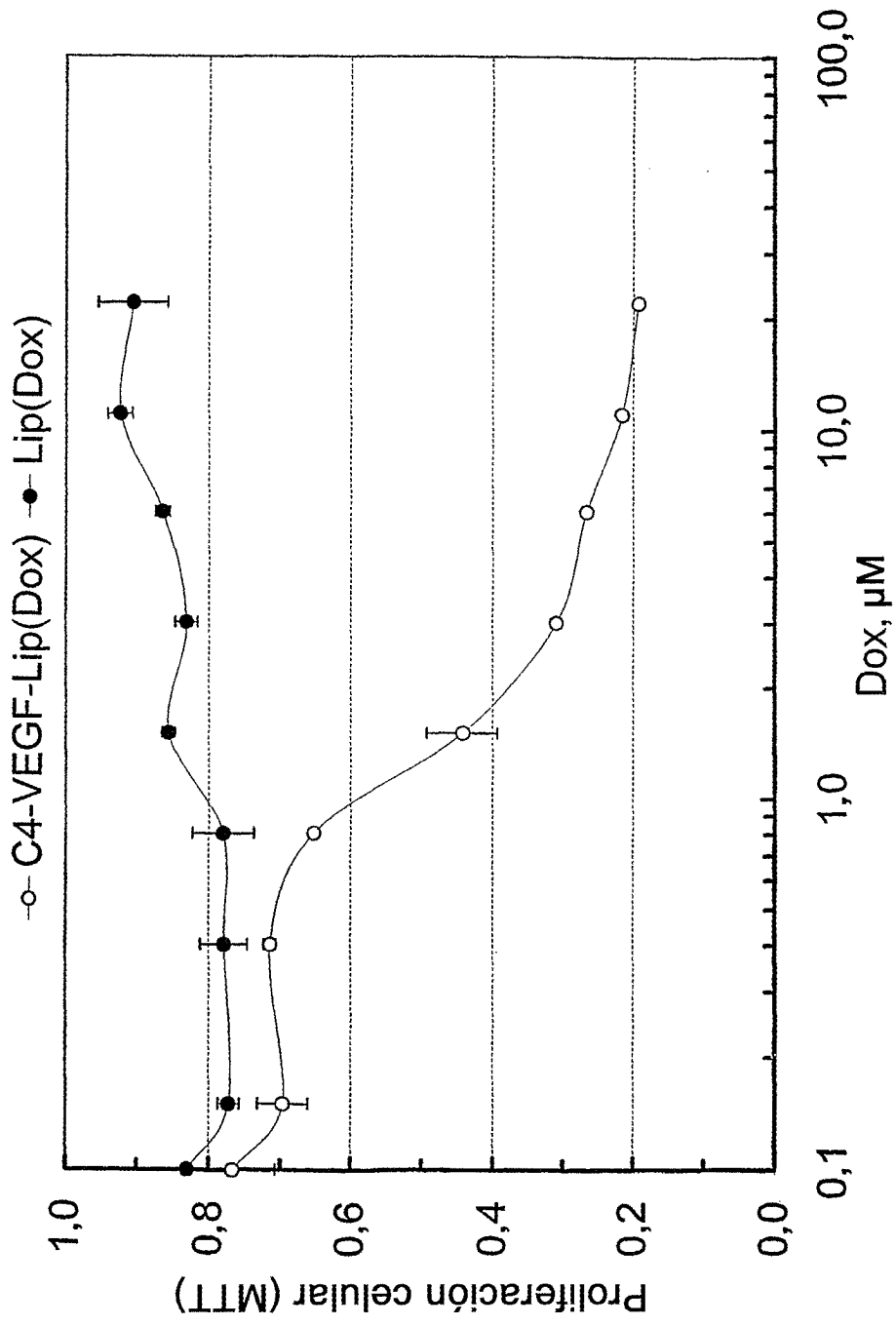


Fig. 7C

Fig 7D

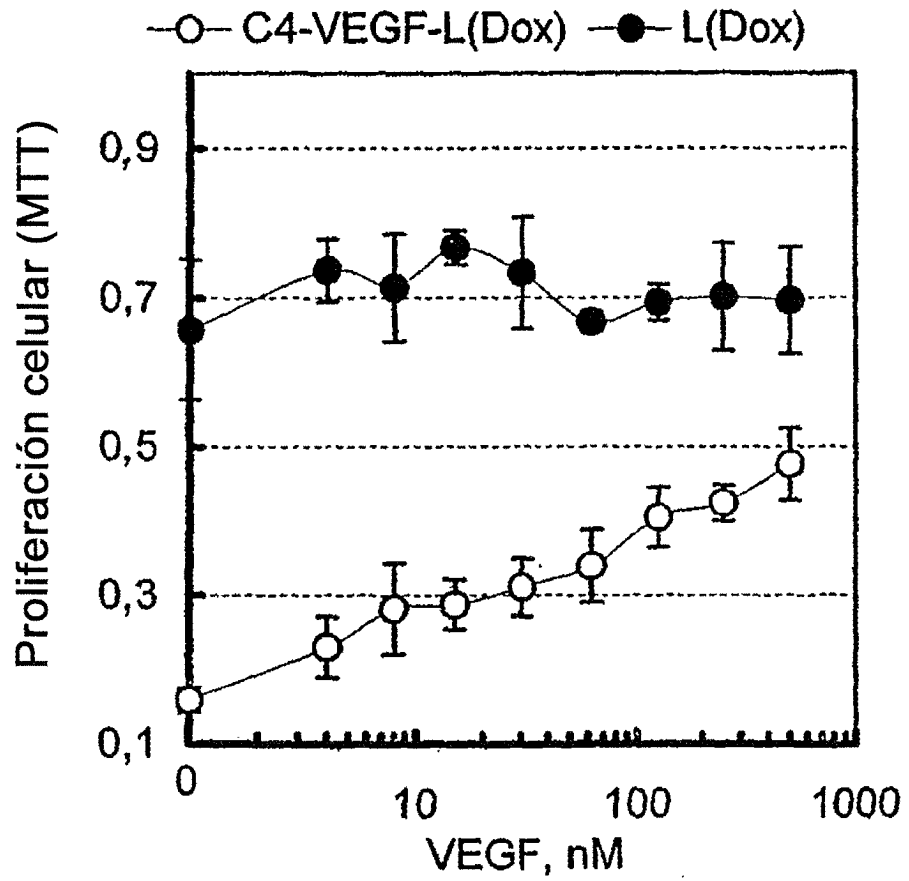


Figura 8A

Desprotección de C4-scVEGF

↓
Proporción molar proteína a DTT de 1:0,5
15 minutos a 25°C

Lipidación de C4-scVEGF desprotegido

↓
Proporción molar de DSPE-mPEG-maleimida a
proteína de 10:1; 2 horas a temperatura ambiente

Inserción de C4-scVEGF lipidado en liposomas cargados de doxorubicina (Doxil™)

↓
Proporción v/v 1:1 de mezcla de reacción de
lipidación a liposomas; 16 horas a 37°C

Purificación de Lip/C4-scVEGF

↓
Fraccionamiento en columna de filtración
en gel de sefarosa 4B

SDS-PAGE y análisis de HPLC de Lip/C4-scVEGF purificado

Fig. 8B Lip/C4-scVEGF

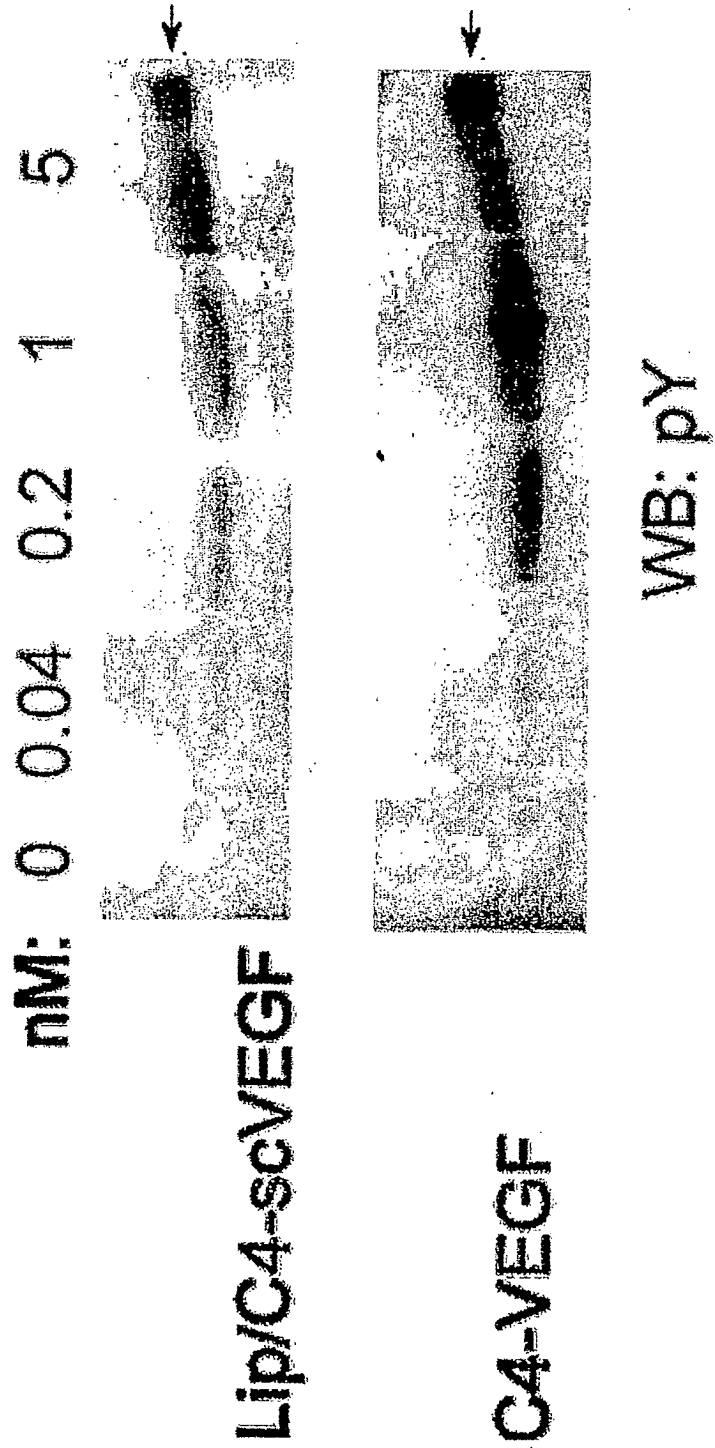


Fig. 8C Lip/C4-scVEGF

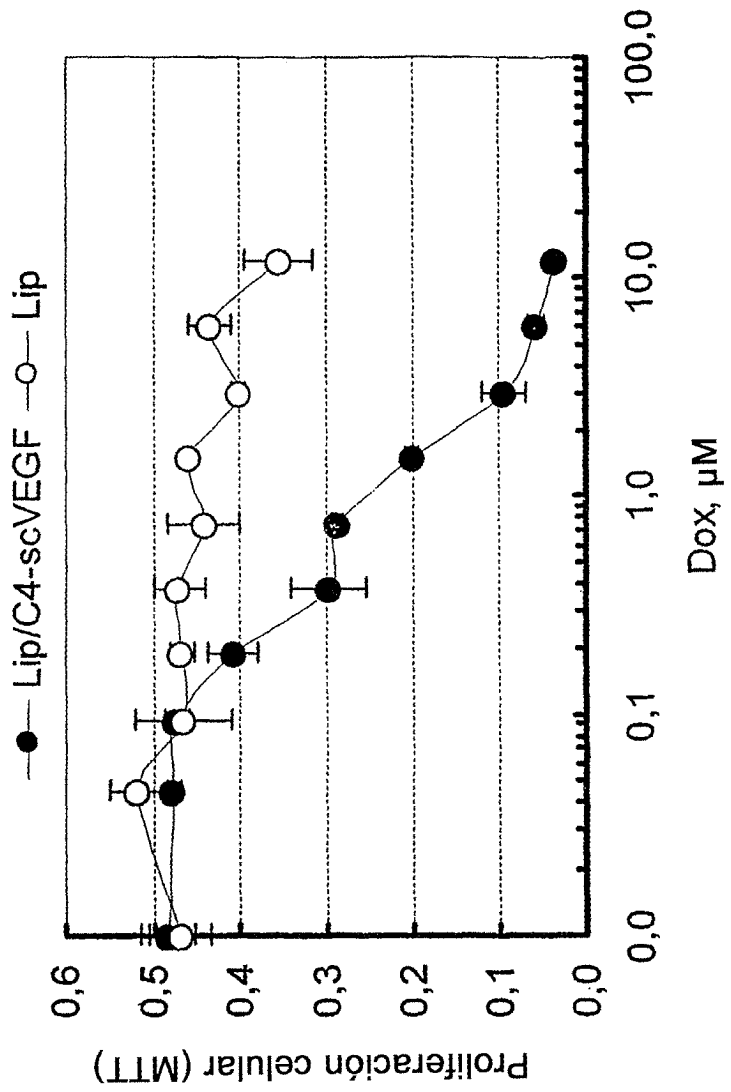


Fig. 8D Lip/C4-scVEGF

