



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 744**

51 Int. Cl.:
C07K 14/78 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06291927 .9**
96 Fecha de presentación : **14.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1798240**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Polipéptidos recombinantes basados en una estructura triple.**

30 Prioridad: **15.12.2005 US 750746 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

73 Titular/es: **INDUSTRIAL TECHNOLOGY
RESEARCH INSTITUTE
No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Road
Chutung Hsinchu, Taiwan 310, CN**

72 Inventor/es: **Chou, Min-Yuan;
Fan, Chia-Yu;
Huang, Chuan-Chuan y
Li, Hsiu-Chuan**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 744 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

Polipéptidos recombinantes basados en una estructura triple

5

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de EE.UU. nº de serie 60/750.746, presentada el 15 de diciembre de 2005.

10

FUNDAMENTO

Los reactivos ligantes basados en proteínas tienen diversos usos en una aplicación terapéutica o diagnóstica. Se ha demostrado que los anticuerpos son un excelente paradigma de dichos reactivos. En realidad, se han usado exitosamente diversos anticuerpos monoclonales (mAbs; del inglés, monoclonal antibodies) para tratar cánceres, enfermedades infecciosas y enfermedades inflamatorias [Adams et al., Nat. Biotechnol., septiembre de 2005; 23 (9): 1147-57].

Se han potenciado tanto la eficacia como la seguridad de los mAbs murinos mediante la tecnología de DNA recombinante, incluyendo la quimerización y la humanización. Sin embargo, la humanización de mAbs murinos utilizando el injerto de regiones determinantes de complementariedad (CDR; del inglés, complementarity determining region) da a menudo lugar a una afinidad ligante menor que la de los equivalentes murinos. La afinidad del anticuerpo es un factor esencial en el éxito de un anticuerpo como agente terapéutico. Un anticuerpo con elevada afinidad permite que el anticuerpo compita eficazmente con el ligando natural por el receptor específico, para reducir la dosis, la toxicidad y el coste. La afinidad también afecta a la farmacocinética del anticuerpo, tal como su distribución y excreción dentro de un tejido específico y la circulación del huésped. Un requisito para un anticuerpo monoclonal eficaz in vivo es una elevada afinidad por el antígeno diana sin unión inespecífica a proteínas no relacionadas. Se ha mostrado que la multimerización de sitios ligantes de antígeno es un medio eficaz para aumentar la intensidad global de la unión de un anticuerpo a un antígeno, que se define como la aidez del anticuerpo (afinidad funcional) (Miller et al., J. Immunol. 170: 4854-4861, 2003; Rheinhecker et al., J. Immunol. 157: 2989-2997, 1996; Shopes, J. Immunol. 148: 2918-2922, 1992; Shuford et al., Science 252: 724-727, 1991; Wolff et al., J. Immunol. 148: 2469-2474, 1992). Tienen una actividad antitumoral in vivo aumentada (Liu et al., Int. Immunopharmacol. 6: 791-799, 2006; Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565, 1993). Debido a la naturaleza bivalente de la inmunoglobulina G (IgG), las IgGs convencional y genéticamente modificada no pueden ser utilizadas para la unión simultánea a más de dos antígenos diferentes. Por lo tanto, existe la necesidad de reactivos ligantes multivalentes o multispecíficos basados en proteínas.

En ciertos casos, para reducir los efectos secundarios de la mitogenicidad, es necesario evitar la función efectora, tal como la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC; del inglés, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC; del inglés, complement dependent cytotoxicity), a través de la modificación genética de la región Fc. Por ejemplo, el mAb murino anti-CD3 humano (Orthoclone OKT3, Muromonab-CD3) es un potente agente inmunosupresor que se dirige al complejo del receptor de células T (TCR; del inglés, T-cell receptor)/CD3 presente sobre células T humanas. Se ha utilizado durante los dos últimos decenios para prevenir o tratar el rechazo de aloinjertos (Cosimi et al., N. Engl. J. Med. 305: 308-314, 1981; Group, N. Engl. J. Med. 313: 337-342, 1985; Kung et al., Science 206: 347-349, 1979). Sin embargo, un importante inconveniente del uso de esta terapia es la liberación sistémica de citocinas tales como TNF- α , IL-2 e IFN- γ , lo que da lugar a una serie de efectos mitogénicos negativos, incluyendo síntomas griposos, insuficiencia respiratoria, síntomas neurológicos y necrosis tubular aguda (Abramowicz et al., Transplantation 47: 606-608, 1989; Chatenoud et al., N. Engl. J. Med. 320: 1420-1421, 1989; Goldman et al., Transplantation 50: 158-159, 1990; Toussaint et al., Transplantation 48: 524-526, 1989). Puesto que la actividad mitogénica de OKT3 y otros mAbs anti-CD3 depende de un intenso entrecruzamiento de TCR/CD3 a través de la unión a células positivas para FcR (por ejemplo, los monocitos), se han dedicado recientes esfuerzos a desarrollar formas no mitogénicas de anticuerpos anti-CD3 por alteración de la unión al FcR. Por lo tanto, existe la necesidad de reactivos ligantes basados en proteínas que presenten una elevada afinidad, un bajo efecto mitogénico y una elevada estabilidad in vivo.

55

SUMARIO

Este invento se refiere a reactivos ligantes basados en complejos proteicos, que presentan una elevada afinidad, un bajo efecto mitogénico y una elevada estabilidad in vivo. Los reactivos también pueden ser multivalentes o multispecíficos.

60

En consecuencia, un aspecto de este invento describe:

un complejo proteico trímero que comprende tres polipéptidos, en que cada polipéptido consiste en:

65

(a) un dominio andamio en bucle de triple hélice que consiste esencialmente en:

(i) una o más repeticiones de triple hélice, en que cada repetición es una secuencia de la fórmula siguiente: (X1-X2-X3)*n*, en que X1 es un resto de Gly, X2 y X3 son cualquier resto de aminoácido, y *n* es cinco o superior;

5 (ii) la ID. SEC. nº 7; o

(iii) la ID. SEC. nº 9;

10 (b) un primer dominio heterólogo fusionado en marco con un extremo del dominio andamio, en que el primer dominio heterólogo es un dominio ligante seleccionado del grupo que consiste en un dominio de anticuerpo, un dominio ligante de ligandos, un ligando, un receptor y un proteoglicano, o que es una proteína fluorescente o un dominio enzimático; y

15 (c) opcionalmente un segundo dominio heterólogo fusionado en marco con el otro extremo del dominio andamio, en que el segundo dominio heterólogo es un dominio ligante seleccionado del grupo que consiste en un dominio de anticuerpo, un dominio ligante de ligandos, un ligando, un receptor y un proteoglicano, o que es una proteína fluorescente o un dominio enzimático;

20 en que los dominios andamio en bucle de triple hélice de los tres polipéptidos interaccionan entre sí para formar un complejo proteico trímero. Los dominios andamio primero, segundo y tercero están alineados para formar un bucle de triple hélice.

25 El primer dominio heterólogo puede incluir la secuencia de un dominio enzimático o una proteína fluorescente. Los ejemplos de una proteína fluorescente incluyen GFP y dsRed, así como sus variantes. Los ejemplos de un dominio enzimático incluyen los de la glutatión S-transferasa, la luciferasa, la β-galactosidasa y la β-lactamasa.

30 El primer dominio heterólogo puede incluir un dominio ligante (por ejemplo, un dominio ligante de ligandos, un ligando, un receptor o un proteoglicano) que se une a una pareja de unión. Una "pareja de unión" se refiere a cualquier molécula que presenta una afinidad covalente o no covalente específica por una porción de un deseado compuesto (por ejemplo, una proteína) de interés. Los ejemplos de parejas de unión incluyen miembros de pares de antígeno/anticuerpo, pares de proteína/inhibidor, pares de receptor/ligando (por ejemplo, pares de receptor nuclear o de superficie celular/ligando), pares de enzima/sustrato (por ejemplo, pares de cinasa/sustrato), pares de lectina/hidrato de carbono, pares proteicos oligómeros o heterooligómeros, pares de proteína ligante de DNA/sitio ligante de DNA, y pares de RNA/proteína. Los ejemplos del dominio ligante también incluyen las secuencias de etiquetas de afinidad, tales como una etiqueta de histidina, una etiqueta myc y una etiqueta de hemaglutinina.

35 El primer dominio heterólogo anteriormente mencionado puede incluir una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina. En consecuencia, el dominio heterólogo puede incluir partes de un anticuerpo que se unen a antígeno, tales como un dominio VH y un Fab. En una realización, el primer dominio heterólogo contiene la secuencia de un fragmento ligante de antígenos o de un anticuerpo de cadena única, por ejemplo, la específica del Grupo de Designación 3 (CD3; del inglés, Cluster of Designation 3) o del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; del inglés, epidermal growth factor receptor). La primera cadena polipeptídica puede contener además un segundo dominio heterólogo fusionado en marco con el otro extremo del primer dominio andamio. Como el primer dominio heterólogo, el segundo dominio heterólogo puede incluir también un dominio que se une a una pareja de unión. Los dominios heterólogos primero y segundo pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Se pueden unir a una pareja de unión idéntica o a dos parejas de unión diferentes. Por ejemplo, el primer dominio heterólogo y el segundo dominio heterólogo pueden contener, respectivamente, las secuencias de un primer anticuerpo de cadena única y un segundo anticuerpo de cadena única que se unen específicamente a CD3 y EGFR, respectivamente.

40 En el complejo proteico anteriormente descrito, la segunda cadena polipeptídica de fusión contiene un tercer dominio heterólogo fusionado en marco con un extremo del segundo dominio andamio, y, opcionalmente, un cuarto dominio heterólogo fusionado en marco con el otro extremo del segundo dominio andamio, o ambos dominios fusionados en marco con los dos extremos. Similarmente, la tercera cadena polipeptídica de fusión contiene un quinto dominio heterólogo fusionado en marco con un extremo del tercer dominio andamio, y, opcionalmente, un sexto dominio heterólogo fusionado en marco con el otro extremo del tercer dominio andamio, o ambos. Como los dominios heterólogos primero y segundo anteriormente descritos, cada uno de estos cuatro dominios heterólogos puede incluir también un dominio ligante que se une a una pareja de unión. Los seis dominios heterólogos pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Por lo tanto, se pueden unir a 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 parejas de unión. En otras palabras, el complejo proteico puede ser monovalente, divalente, trivalente, tetravalente, pentavalente o hexavalente.

45 Para que los dominios andamio primero segundo y tercero formen un bucle de triple hélice, cada uno de los tres dominios andamio contiene una o más repeticiones de triple hélice, conteniendo cada repetición una secuencia de la fórmula siguiente: (X1-X2-X3)*n*, en que X1 es un resto de Gly; X2 y X3 son cualquier resto de aminoácido y, preferiblemente, el iminoácido prolina o hidroxiprolina; y *n* es cinco o superior. Por ejemplo, el dominio andamio primero, segundo o tercero puede incluir (GPP)₁₀ o una o más repeticiones de triple hélice del complemento C1q humano,

colectina, o cadena polipeptídica de colágeno.

En un ejemplo, los polipéptidos de fusión primero, segundo y tercero anteriormente descritos son sustancialmente idénticos, teniendo al menos una identidad secuencial de 75% (por ejemplo, cualquier número entre 75% y 100% inclusive) entre sí. Un complejo formado por tres polipéptidos de fusión idénticos es un homotrímero. Los tres polipéptidos de fusión pueden ser equivalentes funcionales. Un "equivalente funcional" se refiere a un derivado polipeptídico de un polipéptido común, tal como, por ejemplo, una proteína que tiene una o más mutaciones, inserciones, deleciones o truncamientos puntuales, una proteína de fusión, o una combinación de las mismas, y que conserva sustancialmente la capacidad para formar un bucle de triple hélice y la actividad del dominio heterólogo, tal como la unión a un ligando.

Un polipéptido, ácido nucleico o gen heterólogo es uno que procede de una especie extraña o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificado con respecto a su forma original. Dos secuencias o dominios fusionados son heterólogos entre sí si no están adyacentes entre sí en una proteína o ácido nucleico presente en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica que no es parte del minicolágeno humano (tipo XXI) presente en la naturaleza, una proteína de la familia de las colectinas o el complemento 1q (C1q) es heteróloga con respecto a un dominio de la proteína humana.

También se describe aquí un polipéptido recombinante aislado de fusión (por ejemplo, cada uno de los tres polipéptidos de fusión anteriormente mencionados) que contiene (i) un dominio andamio para formar un bucle de triple hélice y (ii) un primer dominio heterólogo fusionado en marco con un extremo del dominio andamio o un segundo dominio heterólogo fusionado en marco con el otro extremo del dominio andamio. El dominio andamio puede contener una o más de las repeticiones de triple hélice anteriormente mencionadas, por ejemplo, la de la cadena polipeptídica de colágeno o el C1q humanos. El dominio heterólogo puede incluir uno de los dominios ligantes anteriormente mencionados y se puede obtener mediante diversos métodos reconocidos en la técnica, tal como la exploración por presentación en fago.

Un polipéptido o complejo proteico aislado se refiere a un polipéptido o un complejo proteico sustancialmente exento de moléculas naturalmente asociadas; es decir, tiene una pureza de al menos 75% (es decir, cualquier número entre 75% y 100% inclusive) por peso en estado seco. La pureza se puede medir mediante cualquier método estándar apropiado, tal como, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliácridamida o análisis por HPLC. Un polipéptido o complejo proteico aislado del invento puede ser purificado a partir de una fuente natural, producido por técnicas de DNA recombinante.

El invento también presenta un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia que codifica el polipéptido de fusión recién mencionado. Un ácido nucleico se refiere a una molécula de DNA (por ejemplo, un cDNA o DNA genómico), una molécula de RNA (por ejemplo, un mRNA), o un compuesto análogo a DNA o RNA. Se puede sintetizar un compuesto análogo a DNA o RNA a partir de compuestos nucleotídicamente análogos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o cadena doble, pero es preferiblemente DNA de cadena doble. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de cualquier ácido nucleico presente en la naturaleza ni a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico presente en la naturaleza. Por lo tanto, la expresión abarca, por ejemplo, (a) un DNA que tiene la secuencia de parte de una molécula de DNA genómico presente en la naturaleza pero que no está flanqueada por las dos secuencias de codificación que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en que se presenta naturalmente; (b) un ácido nucleico incorporado a un vector o al DNA genómico de un procarionte o eucarionte de tal modo que la molécula resultante no es idéntica a ningún DNA genómico o vector presente en la naturaleza; (c) una molécula distinta tal como un cDNA, un fragmento genómico, un fragmento producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia nucleotídica recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica una proteína de fusión. El ácido nucleico anteriormente descrito puede ser utilizado para que se exprese el polipéptido de este invento. Con este fin, se puede enlazar operativamente el ácido nucleico a secuencias reguladoras adecuadas para generar un vector de expresión.

Un vector se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido enlazada. El vector puede ser capaz de replicación autónoma o integrarse en el DNA de un huésped. Los ejemplos del vector incluyen un plásmido, un cósmido y un vector vírico. El vector de este invento incluye un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Preferiblemente, el vector incluye una o más secuencias reguladoras operativamente enlazadas a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Una "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos, así como secuencias reguladoras y/o inducibles tisularmente específicas. El diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, y similares. El vector de expresión se puede introducir en células huésped para que se produzca el polipéptido de este invento. Dentro del alcance de este invento está también una célula huésped que contiene el ácido nucleico anteriormente descrito. Los ejemplos incluyen células de *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, utilizando células S2 de *Drosophila* o células de baculovirus), células de levadura y células de mamífero (por ejemplo células de mieloma NS0 de ratón). Véase, por ejemplo, Goeddel (1990), Gene

Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, EE.UU.).

Para producir un polipéptido de fusión como el aquí descrito, se puede cultivar una célula huésped en un medio bajo unas condiciones que permitan la expresión del polipéptido codificado por un ácido nucleico de este invento y purificar el polipéptido a partir de la célula cultivada o el medio de la célula. Alternativamente, se puede hacer que el ácido nucleico de este invento se transcriba y traduzca in vitro utilizando, por ejemplo, secuencias reguladoras del promotor de T7 y polimerasa de T7.

Para producir un complejo proteico de este invento, se puede cultivar una célula huésped que contenga unos ácidos nucleicos primero, segundo y tercero que codifican, respectivamente, los polipéptidos de fusión primero, segundo y tercero anteriormente mencionados, en un medio bajo unas condiciones que permitan la expresión de los polipéptidos codificados por los tres ácidos nucleicos y la formación de un bucle de triple hélice entre los polipéptidos expresados, y purificar el complejo proteico a partir de la célula cultivada o el medio de la célula. Preferiblemente, la célula huésped es una célula eucariótica que contiene una actividad enzimática que hidroxila un resto de prolina.

En los dibujos adjuntos y la descripción siguiente se exponen los detalles de una o más realizaciones del invento. Otras características, objetos y ventajas del invento resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama que muestra un complejo proteico que tiene un andamio en bucle de triple hélice de minicolágeno, derivado de colágeno humano de tipo XXI. Los seis extremos del bucle de triple hélice están fusionados en marco con seis fragmentos Fv que tienen dominios VL y VH de anticuerpos de cadena única (scFv), respectivamente.

Las Figuras 2A y 2B son, respectivamente, (a) un diagrama que muestra un complejo proteico que tiene un andamio en bucle de triple hélice cuyos tres extremos N están respectivamente fusionados en marco con tres anticuerpos de cadena única, OKT3 (anti-CD3), 528 (anti-EGFR) y erb_scFv (anti-EGFR), y (b) una foto que muestra los resultados de una transferencia Western del complejo proteico. El medio de cultivo de las células S2 de Drosophila establemente transfectadas fue sometido a electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y luego a inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal contra el extremo C del colágeno de tipo XXI, 3E2. T: trímeros enlazados por disulfuros intercatenarios; Mt: monómeros que contienen trímeros enlazados por disulfuros intracatenarios.

La Figura 3 es un diagrama que muestra un complejo proteico que tiene un andamio en bucle de triple hélice. Los tres extremos N del bucle de triple hélice están fusionados en marco con tres anticuerpos de cadena única OKT3; los tres extremos C del bucle de triple hélice están fusionados en marco con tres anticuerpos de cadena única 528.

Las Figuras 4A y 4B son representaciones esquemáticas de diferentes formatos de anticuerpos: (A) anticuerpos de andamio de colágeno: scFv-Col (dibujo izquierdo), que contiene un scFv amino-terminal, una región bisagra de IgG humana, un dominio colágeno (GPP)10 y un dominio NC1 carboxilo-terminal de colágeno de tipo XXI; NSPD-scFv (dibujo derecho), que contiene una porción amino-terminal de una colectina, la proteína tensioactiva D (SPD; del inglés, surfactant protein D), y un scFv en el extremo carboxílico. (B) De izquierda a derecha: inmunoglobulina G (IgG), anticuerpo quimérico (scFv-Fc) y anticuerpo de cadena única (scFv) con sus respectivas masas moleculares aproximadas. Las zonas grises representan los fragmentos VH y VL; líneas discontinuas: enlaces disulfuro intercatenarios.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El presente invento se basa, al menos en parte, en los inesperados hallazgos de que un dominio heterólogo ligante de proteínas fusionado en marco con un dominio andamio humano en bucle de triple hélice conserva la actividad ligante, y de que el polipéptido de fusión resultante forma un bucle de triple hélice. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de un complejo proteico de este invento. Como se muestra en esa figura, los seis extremos de un complejo proteico en bucle de triple hélice están respectivamente fusionados en marco con seis dominios heterólogos ligantes de proteínas, es decir, fragmentos Fv de anticuerpos de cadena única (scFv).

Un complejo proteico de este invento disfruta de ventajas con respecto a los anticuerpos convencionales. Por un lado, cuando dos o más de los seis dominios son idénticos entre sí, el complejo proteico puede tener 2-6 dominios ligantes que sean específicos para una pareja de unión (por ejemplo, un antígeno) en comparación con un anticuerpo convencional, que sólo tiene dos de dichos dominios. En otras palabras, a diferencia de un anticuerpo convencional, que es sólo divalente para un antígeno, el complejo proteico puede ser divalente, trivalente, tetravalente, pentalente o hexavalente. Como resultado, se puede hacer que tenga diversas afinidades que sean mayores que las de un anticuerpo convencional. A causa de las mayores afinidades, se necesitan cantidades del complejo proteico más pequeñas y tiempos de incubación más cortos que en el caso de un anticuerpo convencional para conseguir los objetivos deseados; por ejemplo, efectos terapéuticos, al reducirse por ello los costes de tratamiento y minimizarse los efectos secundarios (por ejemplo, respuestas inmunes indeseadas). Por otro lado, cuando dos o más de los seis

dominios son diferentes entre sí, un complejo proteico de este invento puede tener 2-6 dominios ligantes que sean específicos para 2-6 parejas de unión diferentes. La unificación de múltiples sitios para parejas de unión de diferentes especificidades en una unidad presenta la capacidad de reunir múltiples parejas de unión y, por lo tanto, tiene usos deseables en terapia, reconstrucción tisular, y ensambladura de una maquinaria proteica activa (por ejemplo, una enzima de múltiples subunidades) a nivel de nanómetros.

Para uso in vivo en un ser humano, un complejo proteico de este invento es preferiblemente de origen humano. Por ejemplo, puede incluir una secuencia de anticuerpo de cadena única humanizado fusionada en marco con un andamio en bucle helicoidal de origen humano, tal como el del C1q humano, proteínas de la familia de las colectinas o la cadena polipeptídica de colágeno. Puesto que tanto el colágeno como el C1q humanos son bastante estables en sangre, el complejo proteico es más estable que los anticuerpos convencionales.

El colágeno es la proteína más abundante presente en los mamíferos. Es una proteína de matriz extracelular que contiene la secuencia triplete repetitiva Gly-X1-X2, y la presencia de dichos tripletes permite que tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) del colágeno se plieguen en una conformación de triple hélice. El aminoácido de la posición X2 de la secuencia triplete Gly-X1-X2 es frecuentemente prolina, que es a menudo 4-hidroxilada por modificación postraducciona de la cadena polipeptídica del colágeno con objeto de que se establezca la estructura de triple hélice del colágeno. En ausencia de hidroxilación de prolina, la conformación de triple hélice esencial del colágeno es térmicamente inestable a temperaturas por debajo de la fisiológica (Berg y Prockop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 115-120, 1973; Rosenbloom et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 158: 478-484, 1973). Muchas proteínas de tipo colágeno con dominios colágenos están presentes en el suero humano y sirven como un sistema inmune innato para protección de organismos infecciosos. Éstas incluyen la proteína C1q del complemento, proteínas de la familia de las colectinas –la lectina ligante de manosa (MBL; del inglés, mannose binding lectin)– y las proteínas tensoactivas A y D (SP-A y SP-D). Un rasgo estructural común de estas proteínas de tipo colágeno es que todas ellas están en unidades proteicas multímeras por ensambladura de sus dominios colágenos en triple hélice, lo que va seguido del apilamiento de las moléculas trimeras o su entrecruzamiento por disulfuros intercatenarios. En consecuencia, la afinidad funcional del dominio ligante de estas moléculas de "colágeno de defensa" se ve muy aumentada a través de la multimerización.

Se puede obtener un complejo proteico del invento por tecnología recombinante. Se pueden introducir ácidos nucleicos que codifican polipéptidos del complejo en células huésped adecuadas y hacer que se expresen los polipéptidos bajo unas condiciones que permiten la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos y la formación de un bucle de triple hélice entre los polipéptidos. Para facilitar la formación del andamio en bucle de triple hélice, se puede hacer que se coexpresen la prolil 4-hidroxilasa (P4HA), una enzima esencial en la biosíntesis del colágeno, en las células huésped.

Un dominio proteico heterólogo puede contener un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento del mismo que se une a antígenos). El término "anticuerpo", como aquí se utiliza, se refiere a una molécula inmunoglobulínica o a una porción inmunológicamente activa de la misma, es decir, una porción ligante de antígenos. Se refiere a una proteína que comprende al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de cadena pesada (VH; del inglés, heavy) y al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de cadena ligera (VL; del inglés, light). Las regiones VH y VL pueden ser adicionalmente subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones de armazón" (FR; del inglés, framework regions). Las extensiones de la región de armazón y las CDRs han sido precisamente definidas [véanse Kabat et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U. S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH nº 91-3242, y Chothia et al. (1987), *J. Mol. Biol.* 196: 901-917]. Cada VH y VL está compuesto de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos del extremo aminico al extremo carboxílico en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El anticuerpo puede incluir además una región constante de cadenas pesada y ligera para formar de este modo unas cadenas inmunoglobulínicas pesada y ligera, respectivamente. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio ligante que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median típicamente en la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Como aquí se utiliza, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes inmunoglobulínicos. Los genes inmunoglobulínicos humanos reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de regiones inmunoglobulínicas variables. Las "cadenas ligeras" de longitud completa de las inmunoglobulinas (aproximadamente 25 kDa o 214 aminoácidos) son codificadas por un gen de región variable en el extremo NH2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de longitud completa de las inmunoglobulinas (aproximadamente 50 kDa o 446 aminoácidos) son similarmente codificadas por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante anteriormente mencionados, por ejemplo, el gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos).

La expresión "fragmento ligante de antígeno" de un anticuerpo (o "porción de anticuerpo", o "fragmento"), como aquí se usa, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad para unirse específicamente al antígeno, por ejemplo, un polipéptido EGFR o CD3 o un fragmento del mismo. Los ejemplos de fragmentos ligantes de antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb [Ward et al. (1989), *Nature* 341: 544-546], que consiste en un dominio VH; (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; y (vii) dominios VL o VH. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes distintos, pueden ser unidos, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite construirlos como una sola cadena proteica en que se aparean las regiones VL y VH para formar moléculas monovalentes [conocidas como Fv de cadena única (scFv; del inglés, single chain Fv); véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988), *Science* 242: 423-426; y Houston et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883]. Dichos anticuerpos de cadena única son también abarcados por la expresión "fragmento ligante de antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos utilizando técnicas convencionales conocidas por quienes tienen experiencia en este campo técnico, y los fragmentos son explorados en cuanto a su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

El anticuerpo adecuado puede ser un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser recombinantemente producido; por ejemplo, producido mediante presentación en fago o mediante métodos combinatorios. La presentación en fago y los métodos combinatorios para generar anticuerpos son conocidos en la técnica [véanse, por ejemplo, Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 5.223.409; Kang et al., Publicación Internacional n° WO 92/18619; Dower et al., Publicación Internacional n° WO 91/17271; Winter et al., Publicación Internacional WO 92/20791; Markland et al., Publicación Internacional n° WO 92/15679; Breitling et al., Publicación Internacional WO 93/01288; McCafferty et al., Publicación Internacional n° WO 92/01047; Garrard et al., Publicación Internacional n° WO 92/09690; Ladner et al., Publicación Internacional n° WO 90/02809; Fuchs et al. (1991), *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay et al. (1992), *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse et al. (1989), *Science* 246: 1275-1281; Griffins et al. (1993), *EMBO J.* 12: 725-734; Hawkins et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clackson et al. (1991), *Nature* 352: 624-628; Gram et al. (1992), *PNAS* 89: 3576-3580; Garrard et al. (1991), *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoo-genboom et al. (1991), *Nuc. Acid Res.* 19: 4133-4137; y Barbas et al. (1991), *PNAS* 88: 7978-7982].

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano (por ejemplo, un anticuerpo preparado en un ratón que ha sido genéticamente modificado para que produzca un anticuerpo a partir de una secuencia inmunoglobulínica humana) o un anticuerpo no humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, mono) o camello. Preferiblemente, el anticuerpo no humano es un anticuerpo de roedor (ratón o rata). Los métodos para producir anticuerpos de roedores son conocidos en la técnica.

Se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos usando ratones transgénicos que portan los genes inmunoglobulínicos humanos en lugar del sistema del ratón. Se usan esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés, para producir hibridomas que secretan mAbs humanos con afinidades específicas por epítopos de una proteína humana [véanse, por ejemplo, Wood et al., Solicitud Internacional WO 91/00906, Kucherlapati et al., publicación PCT WO 91/10741; Lonberg et al., Solicitud Internacional WO 92/03918; Kay et al., Solicitud Internacional 92/03917; Lonberg, et al., 1994, *Nature* 368: 856-859; L. L. Green et al., 1994, *Nature Genet.* 7: 13-21; Morrison et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Bruggeman et al., 1993, *Year Immunol.* 7: 33-40; Tuaille et al., 1993, *PNAS* 90: 3720-3724; Bruggeman et al., 1991, *Eur. J. Immunol.* 21: 1323-1326].

Un anticuerpo puede ser uno en que la región variable, o una porción de la misma, por ejemplo, las CDRs, se genera en un organismo no humano, tal como, por ejemplo, una rata o un ratón. Se pueden utilizar anticuerpos quiméricos, con CDR injertado, y humanizados. Dentro del invento están los anticuerpos generados en un organismo no humano, por ejemplo, una rata o un ratón, y luego modificados, por ejemplo, en la región variable, de armazón o constante, para disminuir la antigenicidad en un ser humano.

Se pueden producir anticuerpos quiméricos mediante técnicas de DNA recombinante conocidas en este campo técnico. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal murino (o de otra especie) es sometido a digestión con enzimas de restricción para separar la región que codifica el Fc murino, y ésta es sustituida por la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana [véanse Robinson et al., Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira et al., Solicitud de Patente Europea 184.187; M. Taniguchi, Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison et al., Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger et al., Solicitud Internacional WO 86/01533; Cabilly et al., Patente de EE.UU. n° 4.816.567; Cabilly et al., Solicitud de Patente Europea 125.023; Better et al. (1988), *Science* 240: 1041-1043; Liu et al. (1987), *PNAS* 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun et al. (1987), *PNAS* 84: 214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.* 47: 999-1005; Wood et al. (1985), *Nature* 314: 446-449; y Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559].

Un anticuerpo humanizado o con CDR injertado tendrá al menos una o dos, pero generalmente las tres, CDRs del

receptor (de cadenas inmunoglobulínicas pesadas y/o ligeras) sustituidas por una CDR del donante. El anticuerpo puede estar reemplazado con al menos una porción de una CDR no humana, o sólo algunas de las CDRs pueden estar reemplazadas con CDRs no humanas. Sólo es necesario reemplazar el número de CDRs requeridas para la unión del anticuerpo humanizado o de un fragmento del mismo. Preferiblemente, el donante será un anticuerpo de roedor, por ejemplo, un anticuerpo de rata o ratón, y el receptor será un armazón humano o un armazón de consenso humano. Típicamente, la inmunoglobulina que proporciona las CDRs es llamada "el donante", y la inmunoglobulina que proporciona el armazón es llamada "el aceptor". En una realización, la inmunoglobulina donante es una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de roedor). El armazón aceptor es un armazón presente en la naturaleza (por ejemplo, de un ser humano) o un armazón de consenso, o una secuencia con una identidad de aproximadamente 85% o superior, preferiblemente 90%, 95%, 99% o superior, con respecto al mismo. Como aquí se usa, la expresión "secuencia de consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen más frecuentemente en una familia de secuencias relacionadas [véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987)]. En una familia de proteínas, cada posición de la secuencia de consenso está ocupada por el aminoácido que se presenta más frecuentemente en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se presentan con igual frecuencia, se puede incluir cualquiera de ellos en la secuencia de consenso. Un "armazón de consenso" se refiere a la región de armazón en la secuencia inmunoglobulínica de consenso.

Se puede humanizar un anticuerpo mediante métodos conocidos en la técnica. Se pueden generar anticuerpos humanizados al reemplazar secuencias de la región variable Fv que no están directamente implicadas en la unión al antígeno, por secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. S. L. Morrison, 1985, *Science* 229: 1202-1207; Oi et al., 1986, *Bio Techniques* 4: 214; y Queen et al., Documentos US 5.585.089, US 5.693.761 y US 5.693.762, proporcionan métodos generales para generar anticuerpos humanizados. Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todas, o parte de, la regiones variables Fv inmunoglobulínicas de al menos una cadena pesada o una cadena ligera. Las fuentes de dicho ácido nucleico son bien conocidas por los expertos en la técnica y se pueden obtener, por ejemplo, a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un polipéptido de interés o un fragmento del mismo. El DNA recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo, puede ser luego clonado en un vector de expresión apropiado.

Al andamio también se pueden fusionar anticuerpos humanizados en que se han sustituido, suprimido o añadido aminoácidos específicos. Los anticuerpos humanizados preferidos tienen sustituciones de aminoácidos en la región de armazón, tal como para mejorar la unión a un antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tendrá restos de armazón idénticos al resto de armazón del donante o a otro aminoácido distinto del resto de armazón del receptor. Para generar dichos anticuerpos, se puede reemplazar un número pequeño y seleccionado de restos del armazón aceptor de la cadena inmunoglobulínica humanizada por los correspondientes aminoácidos del donante. Las posiciones preferidas de las sustituciones incluyen restos de aminoácido adyacentes a la CDR o que son capaces de interactuar con una CDR. En el documento US 5.585.089 se describen criterios para seleccionar aminoácidos del donante. En Padlan et al., documento EP 519596 A1, se describen otras técnicas para humanizar anticuerpos.

También se describe aquí un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que forma un complejo proteico de este invento. El ácido nucleico puede ser explorado a partir de un banco de presentación in fago o ser aislado (por ejemplo, mediante RT-PCR) a partir de líneas celulares que expresan los adecuados anticuerpos o derivados de anticuerpo anteriormente descritos. El ácido nucleico puede ser funcionalmente ligado a un vector de expresión. Se pueden utilizar células transformadas con el ácido nucleico o el vector, para producir el polipéptido de fusión o complejo proteico de este invento. Las células útiles para producir un anticuerpo incluyen células de insectos y células de mamíferos (por ejemplo, células CHO o linfáticas).

Se puede conjugar un complejo proteico de este invento con un componente terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puomicina, maitansinoides, por ejemplo, maitansinol (véase la Patente de EE.UU. nº 5.208.020), CC-1065 (véanse las Patentes de EE.UU. números 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545) y compuestos análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo y dacarbazina), agentes alquilantes [por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, CC-1065, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP; cisplatino)], antraciclinas [por ejemplo, daunorrubicina (previamente daunomicina) y doxorubicina], antibióticos [por ejemplo, dactinomicina (previamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)], y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides). Los iones radiactivos incluyen, pero no se limitan a, yodo, itrio y praseodimio.

Los productos de conjugación pueden ser usados para modificar una respuesta biológica dada. El componente farmacológico no ha de ser considerado como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el componente farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posea una deseada actividad biológica. Dichas

5 proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, el interferón α , el interferón β , el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o el activador tisular del plasminógeno; y modificadores de respuestas biológicas, tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; del inglés, granulocyte macrophage colony stimulating factor), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF; del inglés, granulocyte colony stimulating factor) y otros factores de crecimiento.

10 Los productos de conjugación y complejos proteicos anteriormente descritos pueden ser utilizados, basándose en la especificidad de los dominios ligantes heterólogos, para tratar diversos trastornos, incluyendo cánceres, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, enfermedades fibróticas y enfermedades cardiovasculares. También se describe aquí un método para tratar dicho trastorno, por ejemplo, al administrar una cantidad eficaz de un complejo proteico del invento a un sujeto que lo necesita. Los sujetos que se van a tratar pueden ser identificados por tener, o estar en riesgo de adquirir, un estado caracterizado por el trastorno. Este método puede ser llevado a cabo solo o en combinación con otros fármacos u otra terapia.

15 A causa del rasgo multiespecífico de un complejo proteico de este invento, se puede usar éste para conectar moléculas o células que no están normalmente asociadas entre sí. Esta característica es particularmente útil para las terapias basadas en células. En un ejemplo, un dominio heterólogo del complejo proteico es capaz de activar células citotóxicas (por ejemplo, células T citotóxicas) al unirse específicamente a un antígeno efector presente sobre las células citotóxicas, mientras que otro dominio heterólogo se une específicamente a un antígeno diana presente sobre una célula patógena o una célula maligna que se va a destruir. De este modo, con el complejo proteico se puede tratar un trastorno causado por las células patógenas o malignas.

20 La activación de la célula T citotóxica puede tener lugar a través de la unión del antígeno CD3, como un antígeno efector presente en la superficie de la célula T citotóxica, por un complejo proteico del invento. Otros antígenos efector asociados con células linfoides incluyen los antígenos humanos CD16, NKG2D, NKp46, CD2, CD28, CD25, CD64 y CD89. La unión a estos antígenos efectores conduce a la activación de células efectoras tales como monocitos, granulocitos neutrófilos y células dendríticas. Estas células activadas ejercen luego un efecto citotóxico o apoptótico sobre las células diana.

25 El antígeno diana es un antígeno que se expresa únicamente en una célula diana asociada con un estado morbo, pero que no se expresa, se expresa en bajo nivel o no es accesible en un estado sano. Los ejemplos de dichos productos de asociación de antígenos diana con células malignas incluyen EpCAM, CCR5, CD19, HER-2 neu, HER-3, HER-4, EGFR, PSMA, CEA, MUC-1 (mucina), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5.sub.AC, MUC5.sub.B, MUC7, .beta.hCG, Lewis-Y, CD20, CD33, CD30, gangliósido GD3, 9-O-acetil-GD3, GM2, Globo H, fucosil-GM1, Poli-SA, GD2, carboanhidrasa IX (MN/CA IX), CD44v6, Sonic Hedgehog (Shh), Wue-1, antígeno de células plasmáticas, IgE (unido a la membrana), proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP; del inglés, melanoma chondroitin sulfate proteoglycan), CCR8, precursor del TNF-alfa, STEAP, mesotelina, antígeno A33, antígeno de células madre de próstata (PSCA; del inglés, prostate stem cell antigen), Ly-6, desmogleína 4, neopéptido de cadherina E, receptor fetal de acetilcolina, CD25, marcador CA19-9, marcador CA-125 y receptor de tipo II de la sustancia inhibidora mulleriana (MIS; del inglés, Mullerian inhibitory substance), sTn (antígeno Tn sialilado; TAG-72), antígeno de activación de fibroblastos (FAP; del inglés, fibroblast activation protein), endosialina, EGFRvIII, LG, SAS y CD63.

30 El término "tratamiento" se define como la administración de una composición a un sujeto con la finalidad de curar, aliviar, mitigar, remediar, prevenir o mejorar un trastorno, el síntoma del trastorno, el estado morbo secundario al trastorno, o la predisposición al trastorno. Una "cantidad eficaz" es una cantidad de la composición que es capaz de producir un resultado médicamente deseable, por ejemplo, como el anteriormente descrito, en un sujeto tratado.

35 En un planteamiento in vivo, se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición que contiene un complejo proteico del invento) a un sujeto. Generalmente, el complejo está suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, disolución salina fisiológica) y es administrado oralmente o mediante infusión intravenosa, o inyectado o implantado subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonarmente.

40 La dosis requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del sujeto; el tamaño, el peso, el área superficial, la edad y el sexo del sujeto; otros fármacos que se administren; y la opinión del médico que atiende al sujeto. Las dosis adecuadas están en el intervalo de 0,01-100,0 mg/kg. Se han de esperar variaciones en la dosis necesaria a la vista de la diversidad de composiciones disponibles y de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Por ejemplo, se habría de esperar que una administración oral requiriera dosis mayores que una administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ser ajustadas utilizando rutinas empíricas estándares para optimización, como es bien sabido en la técnica. La encapsulación de la composición en un vehículo de distribución adecuado (por ejemplo, micropartículas polímeras o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de la distribución, particularmente la distribución oral.

También dentro del alcance de este invento está una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad eficaz de un complejo proteico del invento. La composición farmacéutica puede ser utilizada para tratar los trastornos anteriormente enumerados. El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un disolvente, un medio de dispersión, un revestimiento, un agente antibacteriano y antifúngico, y un agente isotónico y retardador de la absorción. La composición farmacéutica puede ser formulada en formas de dosificación para las diferentes vías de administración utilizando métodos convencionales.

La eficacia de una composición de este invento puede ser evaluada tanto in vitro como in vivo. Para estudios in vivo, se puede inyectar la composición a un animal (por ejemplo, un modelo de ratón) y se accede luego a sus efectos terapéuticos. Basándose en los resultados, se pueden determinar una vía de administración y un intervalo de dosificación apropiados.

Los ejemplos específicos siguientes han de ser considerados como meramente ilustrativos y en ningún caso limitativos del resto de la descripción. Se cree que un experto en la técnica puede, sin más complicaciones y basándose en la presente descripción, utilizar el presente invento en su total amplitud.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se exploraron bancos de presentación en el fago M13 para identificar un fragmento variable de cadena única (scFv) humano que se une específicamente a EGFR. Se identificaron diversos clones. Después de la confirmación por transferencia Western y ELISA, se seleccionó un clon, erb_scFv, para un experimento ulterior. Se obtuvo el cDNA que codifica erb_scFv y se ligó a un vector de expresión mediante un método estándar. A continuación se exponen la secuencia polipeptídica de erb_scFv (ID. SEC. nº 1) y la secuencia de nucleótidos que la codifica (ID. SEC. nº 2).

ID. SEC. nº 1

**MetAlaGluValGlnLeuLeuGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerLeu
ArgLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPheSerSerTyrAlaMetSerTrpValArg
GlnAlaProGlyLysGlyLeuGluTrpValSerAspIleGlyAlaSerGlySerAlaThr
SerTyrAlaAspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnSerLysAsnThr
LeuTyrLeuGlnMetAsnSerLeuArgAlaGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaLys
SerThrThrThrPheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValserSerGlyGly
GlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerThrAspIleGlnMetThrGln
SerProSerSerLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThrIleThrCysArgAlaSer
GlnSerIleSerSerTyrLeuAsnTrpTyrGlnGlnLysProGlyLysAlaProLysLeu
LeuIleTyrAspAlaSerAlaLeuGlnSerGlyValProSerArgPheSerGlySerGly
SerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerLeuGlnProGluAspPheAlaThrTyr
TyrCysGlnGlnTyrAlaAspTyrProThrThrPheGlyGlnGlyThrLysValGluIle
LysArg**

ID. SEC. nº 2

**ATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGATATTGGTGCTTCTGGTCTGTCTACA
TCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG**

CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA TACTGTGCGAAA
 TCTACTACTACTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGA
 GGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTTCGACGGACATCCAGATGACCCAG
 TCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
 CAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
 CTGATCTATGATGCATCCGCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGA
 TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTAC
 TACTGTCAACAGTATGCTGATTATCCTACTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATC
 AAACGG

Luego se hizo que el vector de expresión se expresara en la línea celular de insecto S2 de Drosophila. Se purificó el erb_scFv anti-EGFR y se sometió a un análisis por transferencia Western y un ELISA para confirmar su especificidad hacia EGFR.

Se llevó a cabo una RT-PCR para obtener cDNAs de líneas celulares de hibridoma que codificaran la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal OKT3 anti-CD3. Luego se ligaron los dos cDNAs para generar una secuencia de fusión que codifica una proteína de fusión de VH-VL de OKT3. A continuación se exponen la secuencia polipeptídica de esta proteína de fusión (ID. SEC. nº 3) y la secuencia de cDNA que la codifica (ID. SEC. nº 4).

ID. SEC. nº 3

ValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSerC
 ysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGly
 GlnGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGln
 LysPheLysAspLysAlaThrLeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnL
 euSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgTyrTyrAspAspHi
 sTyrCysLeuAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerGlyGlyGlyGly
 SerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerAspIleValLeuThrGlnSerProAlaI
 leMetSerAlaSerProGlyGluLysValThrMetThrCysSerAlaSerSerSerValSe
 rTyrMetAsnTrpTyrGlnGlnLysSerGlyThrSerProLysArgTrpIleTyrAspThr
 SerLysLeuAlaSerGlyValProAlaHisPheArgGlySerGlySerGlyThrSerTyrS
 erLeuThrIleSerGlyMetGluAlaGluAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTrpSe
 rSerAsnProPheThrPheGlySerGlyThrLysLeuGluLeuLysArg

ID. SEC. nº 4

GTCCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCC
 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCT
 GGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAAT
 CAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
 CAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGAT
 GATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGA
 GGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATTGTGCTAACCCAGTCT
 CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCA
 AGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATT
 TATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCAGTGGGTCTGGG
 ACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGC
 CAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGA

Se llevaron a cabo los mismos procedimientos para obtener cDNAs que codifican VH y VL del anticuerpo monoclonal 528 anti-EGFR y una secuencia de fusión que codifica una proteína de fusión de VH-VL del anticuerpo 528 anti-EGFR. El anticuerpo monoclonal 528 se une al EGFR de membranas celulares, por ejemplo, de células A431 de carcinoma epidermoide humano. A continuación se exponen la secuencia polipeptídica de este anticuerpo 528 de cadena única (ID. SEC. nº 5) y la secuencia de cDNA que la codifica (ID. SEC. nº 6).

ID. SEC. nº 5

VallLysLeuGlnGluSerGlySerGluMetAlaArgProGlyAlaSerValLysLeuPro
 CysLysAlaSerGlyAspThrPheThrSerTyrTrpMetHisTrpValLysGlnArgHis
 GlyHisGlyProGluTrpIleGlyAsnIleTyrProGlySerGlyGlyThrAsnTyrAla
 GluLysPheLysAsnLysValThrLeuThrValAspArgSerSerArgThrValTyrMet
 HisLeuSerArgLeuThrSerGluAspPheAlaValTyrTyrCysThrArgSerGlyGly
 ProTyrPhePheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerGlyGlyGly
 GlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerMetThrGlnThrProLeuSerLeu
 ProValSerLeuGlyAspGlnAlaSerIleSerCysArgSerSerGlnAsnIleValHis
 AsnAsnGlyIleThrTyrLeuGluTrpTyrLeuGlnArgProGlyGlnSerProLysLeu
 LeuIleTyrLysValSerAspArgPheSerGlyValProAspArgPheSerGlySerGly
 SerGlyThrAspPheThrLeuLysIleSerArgValGluAlaGluAspLeuGlyIleTyr
 TyrCysPheGlnGlySerHisHisProProThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGlu

ID. SEC. nº 6

GTCAAGCTGCAGGAGTCAGGGTCTGAGATGGCGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGCCC
 TGCAAGGCTTCTGGCGACACATTCACCAGTTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCAT
 GGACATGGCCCTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCAGGTAGTGGTGGTACTAACTACGCT
 GAGAAGTTCAAGAACAAGGTCACCTCTGACTGTAGACAGGTCCTCCCGCACAGTCTACATG
 CACCTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTTTGCGGTCTATTATTGTACAAGATCGGGGGGT
 CCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGC
 GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGATGACCCAACTCCACTCTCCCTG
 CCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACAT
 AATAATGGAATCACCTATTTAGAATGGTACCTGCAAAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTC
 CTGATCTACAAAGTTTCCGACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGA
 TCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTAGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTAT
 TACTGCTTTC AAGGTTACATCATCTCCACGTTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGGAA

5

Los cDNAs que codifican los anteriormente descritos scFv03 anti-EGFR, VH-VL de OKT3 y VH-VL de 528 anti-EGFR fueron respectivamente fusionados en marco con el cDNA de minicolágeno XXI humano que contiene una corta secuencia bisagra en el extremo 5' y una secuencia de etiqueta de histidina en el extremo 3'. A continuación se muestran las secuencias polipeptídica y de cDNA del minicolágeno XXI humano (ID. SEC. números 7 y 8, respectivamente).

10

ID. SEC. nº 7

GlyGlyArgGluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSer
 IleProGlyProProGlyProIleGlyProGluGlyProArgGlyLeuProGlyLeuPro
 GlyArgAspGlyValProGlyLeuValGlyValProGlyArgProGlyValArgGlyLeu
 LysGlyLeuProGlyArgAsnGlyGluLysGlySerGlnGlyPheGlyTyrProGlyGlu
 GlnGlyProProGlyProProGlyProGluGlyProProGlyIleSerLysGluGlyPro
 ProGlyAspProGlyLeuProGlyLysAspGlyAspHisGlyLysProGlyIleGlnGly
 GlnProGlyProProGlyIleCysAspProSerLeuCysPheSerValIleAlaArgArg
 AspProPheArgLysGlyProAsnTyrSerLeuAspAspSerSerHisHisHisHis
 HisSerSerGly

15

(nota: Pro = prolina o hidroxiprolina)

ID. SEC. nº 8

**GGCGGCCGCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAAGATCT
 ATTCCTGGGCCACCTGGTCCGATAGGCCAGAGGGTCCAGAGGATTACCTGGTTTGCCA
 GGAAGAGATGGTGTTCCTGGATTAGTGGGTGTCCCTGGACGTCCAGGTGTCAGAGGATTA
 AAAGGCCTACCAGGAAGAAATGGGGAAAAGGGAGCCAAGGGTTTGGGTATCCTGGAGAA
 CAAGGTCCCTGGTCCCCCAGGTCCAGAGGGCCCTCCTGGAATAAGCAAAGAAGGTCCCT
 CCAGGAGACCCAGGTCTCCCTGGCAAAGATGGAGACCATGGAAAACCTGGAATCCAAGGG
 CAACCAGGCCCCCAGGCATCTGCGACCCATCACTATGTTTTAGTGTAATTGCCAGAAGA
 GATCCGTTTCAGAAAAGGACCAAACCTATAGTCTAGACGACAGCAGCCATCATCACCATCAC
 CATAGCAGCGGC**

5 Se cotransfectaron células S2 de *Drosophila* con los tres vectores de expresión resultantes. Se cultivaron las células en presencia de blastidina para seleccionar células resistentes a blastidina. Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares y se exploraron mediante transferencia Western y ELISA en cuanto a actividades de anticuerpos contra EGFR y CD3. Se halló que células de ciertos clones expresaban establemente complejos en triple hélice. Estos complejos en triple hélice, como el minicolágeno XXI humano, eran resistentes al calor y a la pepsina; más importante es que se unían específicamente tanto a EGFR como a CD3.

10

Ejemplo 2

En este ejemplo, se generaron tres polipéptidos de fusión: OKT3_scFv-Col, erb_scFv-Col y erb_NSPD-scFv.

15

Selección de bancos de fagos

Se aisló un fagómido de erb que contenía un fragmento variable (scFv) que se une al dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-ECD; del inglés, EGFR-extracellular domain), por exploración de unos bancos de presentación de scFv humano de plegadura única en fagos (Tomlinson I + J; amablemente proporcionados por I. M. Tomlinson y G. Winter, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Reino Unido). Las selecciones se llevaron a cabo usando inmunotubos (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Dinamarca) revestidos con 10 µg del dominio extracelular recombinante purificado del receptor de EGF (EGFR-ECD; Research Diagnostics, Inc.). El bloqueo, la purificación por inmutofinidad, el lavado, la elución, y la remultiplicación del fago eluido se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

25

Construcción de plásmidos recombinantes

Los cDNAs que codificaban los scFvs de erb fueron multiplicados por PCR a partir del fagómido de erb. Se obtuvo una secuencia que codificaba el mAb IgG2a murino OKT3 anti-CD3 (Ortho Pharmaceutical Corporation), mediante el producto de transcripción inversa del hibridoma OKT3 (ATCC, CRL-8001). Se obtuvieron los cDNAs para los VL y VH del mAb OKT3 mediante RT-PCR, basándose en la secuencia de nucleótidos publicada. Se generó la fusión de scFv de erb y OKT3 por PCR al unir las cadenas VH y VL con un conector de glicocola (GGGS)3.

30

Para generar scFv-Col, la región de codificación de scFv-Col incluía una secuencia de nucleótidos de scFv N-terminal y un gen andamio sintético C-terminal de colágeno que codificaba una secuencia peptídica EPKSCDKTHTCPPCRSIP(GPP)10GICDPSLCFSVIA-RRDPFRKGPNY, que incluye una región bisagra de IgG humana, un dominio colágeno (subrayado) y el dominio NC1 del colágeno de tipo XXI. A continuación se muestran el polipéptido andamio sintético de colágeno y las secuencias de cDNA (ID. SEC. números 9 y 10, respectivamente).

40

ID. SEC. nº 9

**GluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSerIleProGly
ProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProPro
GlyProProGlyProProGlyProProGlyIleCysAspProSerLeuCysPheSerVal
IleAlaArgArgAspProPheArgLysGlyProAsnTyr**

ID. SEC. nº 10

**GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAAGATCTATTCCTGGG
 CCACCTGGTCCCCCAGGTCCCTCCAGGACCCCCAGGGCCCCCAGGCCCCCCGGGCCGCCT
 GGACCCCCAGGGCCACCAGGCCCCCCCAGGCATCTGCGACCCATCACTATGTTTTAGTGTA
 ATTGCCAGAAGAGATCCGTTTCAGAAAAGGACCAAACCTAT**

Se preparó esta secuencia sintética (ID. SEC. nº 10) por PCR solapante, y el producto de PCR flanqueado por sitios NotI y XhoI se clonó en el vector de expresión pSecTag2/Hygro (Invitrogen), en los mismos sitios. Los scFv de erb y OKT3 se clonaron luego en marco con la anterior construcción que contenía el andamio C-terminal de colágeno, en sitios Ascl y NotI, para obtener las construcciones de expresión erb_scFv-Col y OKT3-scFv-Col, respectivamente.

Luego se generó erb_NSPD-scFv. La región de codificación de NSPD-scFv incluía los 254 aminoácidos N-terminales de la proteína tensioactiva D (SPD) humana, un miembro de la familia de las colectinas, y un scFv en el extremo C. A continuación se muestran 254 aminoácidos N-terminales del polipéptido de la proteína tensioactiva D humana y su secuencia de cDNA (ID. SEC. números 11 y 12, respectivamente).

ID. SEC. nº 11

**MetLeuLeuPheLeuLeuSerAlaLeuValLeuLeuThrGlnProLeuGlyTyrLeuGlu
AlaGluMetLysThrTyrSerHisArgThrMetProSerAlaCysThrLeuValMetCys
SerSerValGluSerGlyLeuProGlyArgAspGlyArgAspGlyArgGluGlyProArg
GlyGluLysGlyAspProGlyLeuProGlyAlaAlaGlyGlnAlaGlyMetProGlyGln
AlaGlyProValGlyProLysGlyAspAsnGlySerValGlyGluProGlyProLysGly
AspThrGlyProSerGlyProProGlyProProGlyValProGlyProAlaGlyArgGlu
GlyProLeuGlyLysGlnGlyAsnIleGlyProGlnGlyLysProGlyProLysGlyGlu
AlaGlyProLysGlyGluValGlyAlaProGlyMetGlnGlySerAlaGlyAlaArgGly
LeuAlaGlyProLysGlyGluArgGlyValProGlyGluArgGlyValProGlyAsnThr
GlyAlaAlaGlySerAlaGlyAlaMetGlyProGlnGlySerProGlyAlaArgGlyPro
ProGlyLeuLysGlyAspLysGlyIleProGlyAspLysGlyAlaLysGlyGluSerGly
LeuProAspValAlaSerLeuArgGlnGlnValGluAlaLeuGlnGlyGlnValGlnHis
LeuGlnAlaAlaPheSerGlnTyrLysLysValGluLeuPhe**

ID. SEC. nº 12

**ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCCCCTGGGCTACCTGGAA
GCAGAAATGAAGACCTACTCCACAGAACAATGCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGT
AGCTCAGTGGAGAGTGGCCTGCCGGTCCGATGGACGGGATGGGAGAGAGGGCCCTCGG
GGCGAGAAGGGGGACCCAGGTTTGCCAGGAGCTGCAGGGCAAGCAGGGATGCCTGGACAA
GCTGGCCCAGTTGGGCCAAAGGGGACAATGGCTCTGTTGGAGAACCCTGGACCAAGGGGA
GACACTGGGCCAAGTGGACCTCCAGGACCTCCCGGTGTGCCTGGTCCAGCTGGAAGAGAA
GGTCCCCTGGGGAAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAGGGCAAGCCAGGCCCAAAGGAGAA
GCTGGGCCCAAAGGAGAAGTAGGTGCCCCAGGCATGCAGGGCTCGGCAGGGGCAAGAGGC
CTCGCAGGCCCTAAGGGAGAGCGAGGTGTCCCTGGTGAGCGTGGAGTCCCTGGAAACACA
GGGGCAGCAGGGTCTGCTGGAGCCATGGGTCCCAGGGAAGTCCAGGTGCCAGGGGACCC
CCGGGATTGAAGGGGGACAAAGGCATTCTTGAGACAAAGGAGCAAAGGGAGAAAGTGGG
CTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCAC
CTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTC**

El cDNA de SPD N-terminal fue clonado en el vector de expresión pSecTag2/Hygro (Invitrogen), en los sitios NheI y Ascl. El scFv de erb fue luego clonado en marco con la anterior construcción que contenía SPD N-terminal, en sitios Ascl y XhoI, para obtener la construcción de expresión erb_NSPD-scFv.

Cada marco de lectura abierto de erb_scFv-Col, erb_NSPD-scFv y OKT3_scFv-Col contenía secuencias que codificaban unas secuencias líder N-terminales y etiquetas C-terminales de epítipo myc/polihistidina con fines de secreción, detección y purificación. En la tabla siguiente se resumen diversos anticuerpos/proteínas recombinantes codificados por las construcciones de expresión anteriormente descritas.

Tabla 1. Visión general de diversas moléculas de anticuerpo usadas en este estudio

Anticuerpo	Diana	Tipo	Origen del Ab
erb_scFv-Col	EGFR-ECD	CSA1	humano
erb_scFv-Fc	EGFR-ECD	scFv-Fc	humano
erb_scFv	EGFR-ECD	scFv	humano
erb_NSPD-scFv	EGFR-ECD	CSA	humano
OKT3_scFv-Col	CD3	CSA	murino
OKT3	CD3	IgG	murino

¹Anticuerpo de andamio de colágeno

Expresión y purificación de anticuerpos

Para generar los complejos proteicos/anticuerpos recombinantes, se transfectaron células de mieloma NS0 de ratón con las construcciones anteriormente descritas usando Effectene (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de una selección con higromicina (400 µg/ml) durante 4 semanas, cada clon estable fue cultivado en un matraz sacudido con una densidad inicial de siembra de 2 x 10⁵ células/ml en un medio químicamente definido, HyQCDM4NS0 (Hyclone), que contenía 2% de suero bovino fetal. Se mantuvo el cultivo a 150 rpm durante cinco días a 37 °C. Se añadió diariamente ascorbato sódico (80 µg/ml) a los medios de cultivo para las células que portaban construcciones de expresión que codificaban proteínas que contenían los dominios de anticuerpo anteriormente mencionados y el dominio andamio de colágeno, es decir, anticuerpos de andamio de colágeno (CSA; del inglés, collagen scaffold antibodies).

Para purificar la proteína erb_scFv, erb_scFv-Fc, erb_scFv-Col u OKT3_scFv-Col o los complejos proteicos, se aplicaron aproximadamente 2 l de cada uno de los medios de cultivo filtrados a una columna T-Gel (1,5 x 8 cm, Pierce) equilibrada con tampón de Tris 50 mM-HCl, pH de 8,0, con un caudal de 60 ml/hora. Después de un lavado con el mismo tampón, los complejos proteicos o proteína recombinantes fueron eluidos con tampón de acetato sódico 50 mM, pH de 4,0. Se controló su absorbancia UV a 280 nm y se aplicó la fracción de pico a una columna HighTrap de Sepharose quelante cargada con ZnSO₄ (1 ml de volumen de lecho, GE Healthcare), equilibrada con tampón de Tris 50 mM-HCl que contenía NaCl 0,5 M, pH de 8,0, con un caudal de 60 ml/hora. La columna fue primero lavado con imidazol 20 mM, y los complejos proteicos o proteína unidos fueron eluidos con imidazol 0,25 M en el mismo tampón. La preparación final fue dializada frente a tampón de Hepes 50 mM, pH de 7,0.

Luego se llevó a cabo una SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida bis-Tris NuPAGE al 10% con MOPS o un gel de poliacrilamida Tris-acetato/SDS al 7%, con acetato sódico como tampón de desarrollo (Invitrogen). Luego se tiñeron las proteínas con azul brillante de Coomassie R-250. Se cuantificaron las densidades de las bandas proteicas por densitometría usando un sistema Chemilmager 5500 (Alpha Innotech, San Leandro, California, EE.UU.) con el software Alpha EaseFC (versión 4.0; Alpha Innotech).

Para examinar la naturaleza triplemente helicoidal, se incubó erb_scFv-Col purificado (1 mg/ml) a 37 °C durante una hora en ausencia o presencia de DTT 10 mM. Una parte alícuota de la muestra tratada con DTT fue luego hecha reaccionar con N-etil-maleimida (NEM) 50 mM durante 30 minutos a temperatura ambiental para bloquear permanentemente los sulfhidrilos libres y la reformación de trímeros. Una cantidad igual de proteína de cada muestra fue sometida a electroforesis en un gel de poliacrilamida Tris-acetato/SDS al 7%, con acetato sódico como tampón de desarrollo. El gel fue teñido con azul de Coomassie. Se halló que los CSAs purificados eran homotrímeros o hexámeros enlazados por disulfuros intercatenarios, los cuales pueden ser disociados en dos trímeros bajo condiciones reductoras suaves.

Se examinó la estabilidad térmica de la estructura trímera de erb_scFv-Col. El erb_scFv-Col purificado, en Tris 50 mM-HCl (pH de 8,0) que contenía urea 2 M, fue tratado en ausencia o presencia de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 mM a temperatura ambiental. Las muestras reducidas fueron luego alquiladas con NEM 50 mM a temperatura ambiental. Cada muestra con una cantidad igual de proteína fue calentada durante 10 minutos a 35, 45, 55, 65, 75 y 85 °C antes de mezclar el tampón de carga con SDS. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida Bis-Tris/SDS al 10% con el tampón MOPS bajo condiciones no reductoras. El gel fue teñido con azul de Coomassie. El resultado indicó que el trímero erb_scFv-Col presentaba una elevada estabilidad térmica. En realidad, después de un tratamiento a 65 °C durante 10 minutos, quedaron más del 50% de los trímeros. Se halló también que la estructura trímera del dominio colágeno de erb_scFv-Col estaba prolii-hidroxilada.

Estudios de unión

Se midió la cinética de unión de variantes de anticuerpo erb hacia el EGFR-ECD usando un biosensor BIAcore X (BIAcore, Inc., Uppsala, Suecia) en el tampón de desarrollo HBS-EP (HEPES 10 mM, pH de 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, agente tensioactivo P20 al 0,005%). En resumen, se inmovilizó EGFR-ECD sobre un chip sensor C1 por medio de copulación amínica hasta un nivel de 1700 unidades de respuesta (RU; del inglés, response unit) y se inyectaron anticuerpos purificados en diferentes concentraciones con un caudal de 10 µl/min. La superficie fue regenerada mediante la inyección de 5 µl de glicocola 10 mM-HCl, pH de 3,5. Se obtuvieron sensogramas para cada concentración y se evaluaron utilizando el programa BIA Evaluation 3.2. Los datos de unión fueron ajustados con un modelo de unión de Langmuir 1:1 para calcular la constante de afinidad, KD, que fue definida como la relación entre la velocidad de disociación (k_{dis}) y la velocidad de asociación (k_{as}). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

60

Tabla 2. Cinética de unión de diversas formas de anticuerpo erb hacia EGFR-ECD inmovilizado

Anticuerpo	kas/105	kdis/10-4	KD
	M-1s-1	s-1	nM
erb_scFv-Col	1,72	8,22	4,78
erb_scFv-Fc	0,909	94,4	104
erb_scFv	0,15	741	4960

Como se muestra en la Tabla 2, la afinidad ligante de erb_scFv-Col por EGFR-ECD es aproximadamente 20 y 1000 veces mayor que la de los equivalentes mAbs bivalente (erb_scFv-Fc) y monovalente (erb_scFv), respectivamente.

5

Ensayos de estabilidad y farmacocinética

Para el ensayo de estabilidad en suero, se determinó la estabilidad de diversas formas del anticuerpo erb_scFv-Col, erb_scFv-Fc o erb_scFv mediante incubación con suero humano a 37 °C. Mediante un ELISA cuantitativo se midió la cantidad de anti-EGFR activo que quedaba después de diferentes períodos de tiempos de incubación. El ELISA se llevó a cabo empleando el EGFR-ECD recombinante (como reactivo de captura) y mAb anti-c-myc (9E10, Sigma Chemical Co.), seguidos de una IgG policlonal anti-ratón generada en cabra, purificada por afinidad y conjugada con HRP, y sustratos quimioluminiscentes (Pierce Biotechnology, Inc.). Para el ensayo farmacocinético, se usaron tres ratones desnudos BALB/c para analizar el aclaramiento de erb_scFv-Col. En resumen, después de una sangría previa, se inyectaron subcutáneamente (s.c.) 25 µg (2 mg/kg de peso corporal) de erb_scFv-Col a cada ratón. Durante las 70 horas siguientes, se recogieron periódicamente muestras sanguíneas y se evaluaron en cuanto a su contenido de erb_scFv-Col por ELISA. Se halló que las proteínas eran bastante estables.

10

15

20

Ensayo de proliferación de células T y reacción mixta de linfocitos (MLR)

Se llevó a cabo el ensayo de proliferación celular con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). En resumen, se sembraron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; del inglés, peripheral blood mononuclear cells) humanas en una placa negra de 96 pocillos con fondo plano para cultivo tisular, en una cantidad de 2 x 10⁵ células/pocillo en 100 µl de medio RPMI-1640 con FBS al 10%, a 37 °C durante 66 horas, en presencia de diluciones sucesivas de 10 órdenes de magnitud de OKT3 (eBioscience, Inc.) u OKT3_scFv-Col. Las células fueron luego estimuladas con BrdU 10 µM durante 6 horas. Después de separar el medio de cultivo, las células fueron fijadas y el DNA fue desnaturado en un paso con FixDenat. A continuación, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-BrdU marcado con peroxidasa (anti-BrdU POD, fragmentos Fab) durante 1,5 horas a temperatura ambiental. Se llevaron a cabo la detección y la cuantificación por quimioluminiscencia utilizando un luminómetro para microplacas (Hidex, plataforma de detección CHAMELEON, Finlandia).

25

30

Se evaluaron la proliferación e inmunosupresión de células T en la reacción mixta de linfocitos de una vía del modo siguiente. Se obtuvieron PBMCs humanos de dos donantes sanos (estimador y respondedor). Las células estimuladoras o respondedoras fueron tratadas con 25 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich) en un medio completo (RPMI 1640 complementado con suero AB humano al 10%, glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 nM y 100 unidades/ml tanto de penicilina como de estreptomina) durante 30 minutos en aire humidificado que contenía CO₂ al 5%, a 37 °C, lo que fue seguido de tres lavados en medio RPMI 1640. Las células respondedoras fueron cultivadas solas o mezcladas con células estimuladoras tratadas con mitomicina C o respondedoras tratadas con mitomicina C en una relación 1:1, en una cantidad de 2 x 10⁵ células/pocillo en 200 µl de medio completo. Se añadió OKT3 u OKT3_scFv-Col purificado en diferentes concentraciones a los cultivos inmediatamente después de la siembra de las células respondedoras. Después de 5 días, las células cultivadas fueron estimuladas con BrdU 10 µM y recolectadas 24 horas más tarde. Luego se llevó a cabo el ensayo de proliferación celular de la manera anteriormente descrita.

35

40

Se halló que OKT3-scFv-Col es más eficaz a la hora de inmunosuprimir la proliferación de células T mientras presenta una insignificante actividad mitogénica a la hora de estimular la proliferación de células T.

45

Medición de citocinas

Se sembraron PBMCs humanos en una cantidad de 2 x 10⁵ células/pocillo en 0,1 ml de medio RPMI-1640 con FBS al 10%, a 37 °C, en presencia de diluciones sucesivas de 10 órdenes de magnitud de OKT3 u OKT3_scFv-Col. Se recolectaron los sobrenadantes en diferentes momentos y se midieron múltiples citocinas usando un kit para inmunoensayo de citocinas humanas (eBioscience, Inc.). Los resultados indicaron que la administración de OKT3_scFv-Col causa una insignificante liberación de citocinas en comparación con el mAb OKT3 murino.

50

Ensayos de desplazamiento de anticuerpos

Todos los procedimientos siguientes se llevaron a cabo a 4 °C. Se suspendieron células T humanas en un tampón FCM (disolución salina tamponada con fosfato, con FBS al 2% y azida sódica al 0,1%) con una densidad de 1 x 10⁶

- 5 células/ml. Las células fueron tratadas con IgGs totales de ratón (2 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 30 minutos y fueron luego incubadas con diluciones sucesivas de anticuerpo OKT3 u OKT3_scFv-Col durante 1 hora. Se añadió directamente una cantidad saturante fija (determinada por citometría de flujo) de OKT3 conjugado con FITC (0,25 µg/ml, adquirido a eBioscience, Inc.). Después de 1 hora de incubación, las células fueron lavadas con el tampón FCM y analizadas en cuanto a inmunofluorescencia por citometría de flujo en un sistema FacScan (Becton Dickinson, San José, California, EE.UU.). Los datos se presentaron como porcentaje de inhibición de la intensidad máxima de fluorescencia, que se define como la intensidad media de fluorescencia obtenida al teñir células T con OKT3-FITC en ausencia de anticuerpos bloqueantes.
- 10 El resultado indicó que OKT3_scFv-Col se une a células T CD3+ humanas más fuertemente que el mAb OKT3 murino nativo.
- 15 Se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo Bradford (Coomassie más reactivo, de Pierce Biotechnology, Inc.) utilizando IgGs humanas como patrón. Para el análisis de aminoácidos, el erb_scFv-Col purificado fue dializado frente a ácido acético 50 mM, hidrolizado en HCl 6 N a 110 °C durante 24 horas y sometido al análisis de aminoácidos en un sistema Waters Pico-Tag®.
- 20 Estos resultados demuestran que el anticuerpo de andamio de colágeno debería ser una estructura ideal para el diseño de anticuerpos terapéuticos en aplicaciones tanto antitumorales como inmunomoduladoras.

REIVINDICACIONES

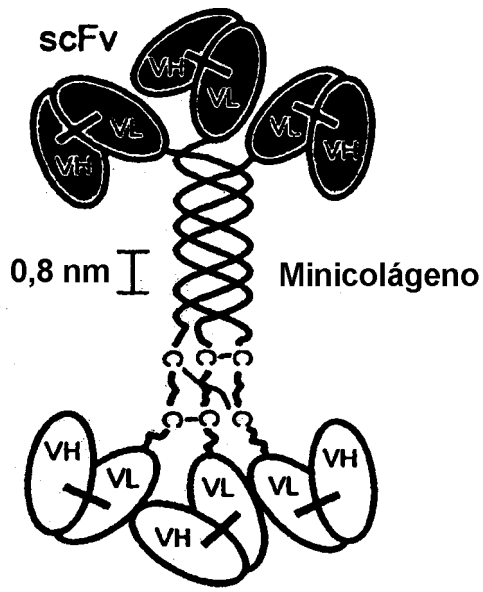
1. Un complejo proteico trímero que comprende tres polipéptidos, en que cada polipéptido consiste en:
- 5 (a) un dominio andamio en bucle de triple hélice que consiste esencialmente en:
- (i) una o más repeticiones de triple hélice, en que cada repetición es una secuencia de la fórmula siguiente: $(X1-X2-X3)_n$, en que X1 es un resto de Gly, X2 y X3 son cualquier resto de aminoácido, y n es cinco o superior;
- 10 (ii) la ID. SEC. nº 7; o
- (iii) la ID. SEC. nº 9;
- 15 (b) un primer dominio heterólogo fusionado en marco con un extremo del dominio andamio, en que el primer dominio heterólogo es un dominio ligante seleccionado del grupo que consiste en un dominio de anticuerpo, un dominio ligante de ligandos, un ligando, un receptor y un proteoglicano, o que es una proteína fluorescente o un dominio enzimático; y
- 20 (c) opcionalmente un segundo dominio heterólogo fusionado en marco con el otro extremo del dominio andamio, en que el segundo dominio heterólogo es un dominio ligante seleccionado del grupo que consiste en un dominio de anticuerpo, un dominio ligante de ligandos, un ligando, un receptor y un proteoglicano, o que es una proteína fluorescente o un dominio enzimático;
- 25 en que los dominios andamio en bucle de triple hélice de los tres polipéptidos interactúan entre sí para formar un complejo proteico trímero.
2. El complejo proteico de la Reivindicación 1, en que X2 y X3 son cualquier resto de prolina o hidroxiprolina.
- 30 3. El complejo proteico de cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 2, en que uno o más restos de prolina son sustituidos por hidroxiprolina.
4. El complejo proteico de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en que el primer dominio heterólogo es un dominio de anticuerpo.
- 35 5. El complejo proteico de la Reivindicación 4, en que el dominio de anticuerpo está fusionado en marco con el extremo amino del dominio andamio.
6. El complejo proteico de la Reivindicación 4, en que el dominio de anticuerpo está fusionado en marco con el extremo carboxílico del dominio andamio.
- 40 7. El complejo proteico de la Reivindicación 4, en que el dominio de anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de complementariedad de una inmunoglobulina.
- 45 8. El complejo proteico de la Reivindicación 7, en que el dominio de anticuerpo comprende la secuencia de un fragmento ligante de antígeno.
9. El complejo proteico de la Reivindicación 8, en que el fragmento ligante de antígeno se une específicamente a CD3.
- 50 10. El complejo proteico de la Reivindicación 9, en que el fragmento ligante de antígeno comprende:
- (i) la ID. SEC. nº 3, o
- 55 (ii) una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la ID. SEC. nº 4.
11. El complejo proteico de la Reivindicación 8, en que el fragmento ligante de antígeno se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
- 60 12. El complejo proteico de la Reivindicación 11, en que el fragmento ligante de antígeno comprende:
- (i) la ID. SEC. nº 1, o
- (ii) una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la ID. SEC. nº 2.
- 65 13. El complejo proteico de la Reivindicación 11, en que el fragmento ligante de antígeno comprende:

- (i) la ID. SEC. nº 5, o
- (ii) una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la ID. SEC. nº 6.
- 5 14. El complejo proteico de la Reivindicación 9 u 11, en que el fragmento ligante de antígeno comprende un anticuerpo de cadena única.
15. El complejo proteico de la Reivindicación 4, en que cada polipéptido tiene un segundo dominio heterólogo que consiste en un segundo dominio de anticuerpo.
- 10 16. El complejo proteico de la Reivindicación 15, en que el primer dominio de anticuerpo comprende un primer anticuerpo de cadena única que se une específicamente a CD3.
17. El complejo proteico de la Reivindicación 16, en que el primer anticuerpo de cadena única comprende:
- 15 (i) la ID. SEC. nº 3, o
- (ii) una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la ID. SEC. nº 4.
- 20 18. El complejo proteico de cualquiera de las Reivindicaciones 15 a 17, en que el segundo dominio de anticuerpo comprende un segundo anticuerpo de cadena única que se une específicamente a EGFR.
19. El complejo proteico de la Reivindicación 18, en que el segundo anticuerpo de cadena única comprende:
- 25 (i) la ID. SEC. nº 1, o
- (ii) una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la ID. SEC. nº 2.
- 30 20. El complejo proteico de la Reivindicación 18, en que el segundo anticuerpo de cadena única comprende:
- (i) la ID. SEC. nº 5, o
- (ii) una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la ID. SEC. nº 6.
- 35 21. El complejo proteico de la Reivindicación 1, en que el dominio andamio comprende 10 repeticiones G-P-P.
22. El complejo proteico de la Reivindicación 1, en que el dominio heterólogo de al menos uno de los polipéptidos es un dominio enzimático o una proteína fluorescente.
- 40 23. El complejo proteico de la Reivindicación 1, en que los tres polipéptidos son sustancialmente idénticos.
24. El complejo proteico de la Reivindicación 1, en que los tres polipéptidos contienen dominios heterólogos diferentes.
- 45 25. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de la Reivindicación 1.
26. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la Reivindicación 25.
- 50 27. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de la Reivindicación 25 o un vector de expresión de la Reivindicación 26.
28. La célula huésped de la Reivindicación 27, en que la célula es una célula de mamífero o una célula de insecto.
- 55 29. La célula huésped de la Reivindicación 28, en que la célula de mamífero es una célula de mieloma NS0 de ratón.
30. Una composición farmacéutica que comprende el complejo proteico de cualquiera de las Reivindicaciones 1-24.
- 60 31. Un método para producir un complejo proteico trímero de la Reivindicación 1, que comprende
- cultivar una célula huésped que contiene un primer ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que contiene un primer dominio andamio de triple hélice y un primer dominio heterólogo fusionado con un extremo del primer dominio andamio, un segundo ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que contiene un segundo dominio andamio de triple hélice, y un tercer ácido nucleico que codifica una tercera cadena polipeptídica que contiene un tercer dominio andamio de triple hélice, en un medio bajo unas condiciones que permiten la expresión de los polipéptidos codificados por los tres ácidos nucleicos y la formación de un
- 65

bucle de triple hélice entre ellos; y

purificar el complejo proteico a partir de la célula cultivada o del medio de la célula.

- 5 32. Un método de acuerdo con la Reivindicación 31, en que la célula huésped es una célula eucariótica que contiene una actividad enzimática que hidroxila un resto de prolina.



Anticuerpo de andamio de colágeno

FIGURA 1

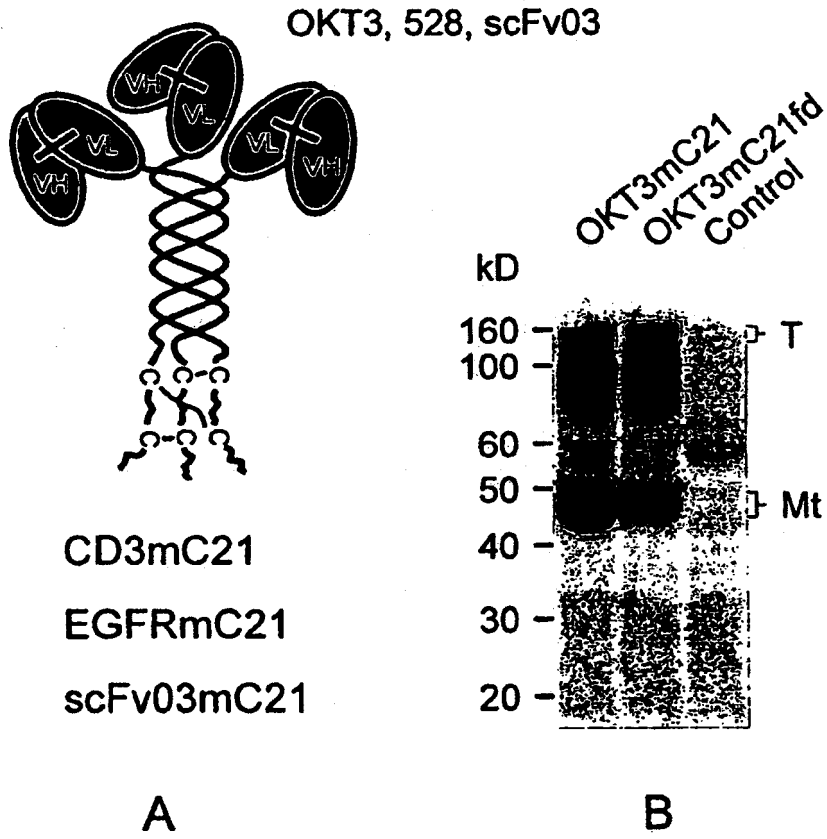
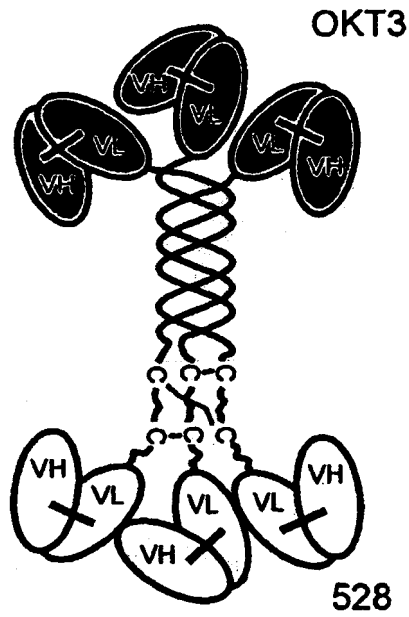


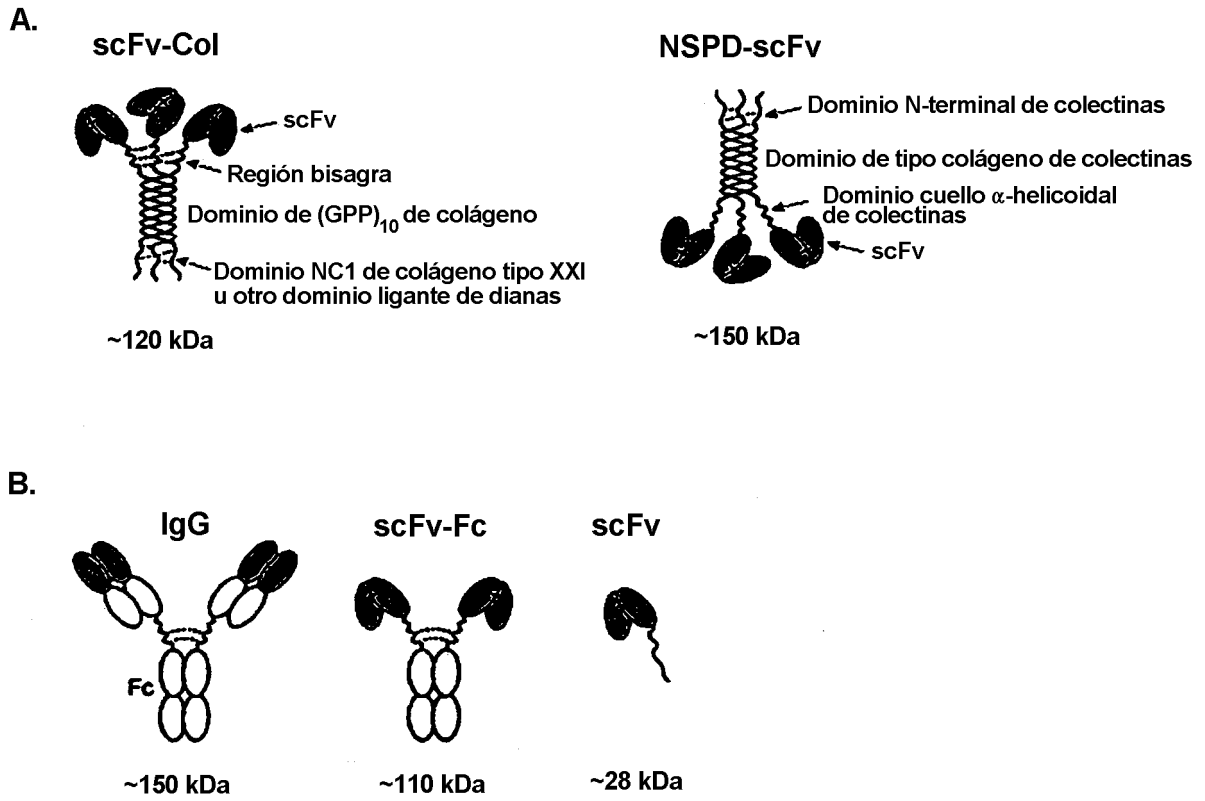
FIGURA 2



CD3mC21 x EGFR

Acoplador biespecífico de células T

FIGURA 3



FIGURAS 4A y 4B