



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 371 426**

② Número de solicitud: 200901027

⑤ Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **20.04.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2012**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
02.01.2012

⑰ Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Cuesta Martínez, Ángel;
Sánchez Martín, David;
Sanz Alcober, Laura;
Compte Grau, Marta;
Bonilla Velasco, Félix y
Álvarez Vallina, Luis**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Proteínas oligoméricas y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Proteínas oligoméricas y sus aplicaciones.

Las proteínas oligoméricas comprenden una pluralidad de proteínas de fusión y un marcador, comprendiendo cada proteína de fusión un polipéptido que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo, y un polipéptido que comprende un dominio de oligomerización. Dichas proteínas oligoméricas pueden utilizarse para detectar, visualizar y localizar dianas de interés.

DESCRIPCIÓN

Proteínas oligoméricas y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con una proteína oligomérica que comprende una pluralidad de proteínas de fusión, iguales o diferentes, y un marcador, en la que cada proteína de fusión comprende un polipéptido que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo, y un polipéptido que comprende un dominio de oligomerización. Dichas proteínas oligoméricas pueden ser utilizadas para detectar, visualizar y localizar dianas de interés.

15 **Antecedentes de la invención**

Los procedimientos de imagen en medicina se refieren a técnicas y procesos no invasivos usados para crear imágenes del aspecto interno del cuerpo de un animal, para propósitos clínicos, por ejemplo, procedimientos médicos para diagnosticar una enfermedad o para localizar dicha enfermedad. En un sentido amplio, incluye técnicas tales como ciencias radiológicas, endoscopia, termografía médica y microscopía. Tradicionalmente, los estudios de laboratorio para evaluar la actividad de las terapias anticancerígenas en ratones han requerido el sacrificio de múltiples animales en cada etapa para proporcionar datos significativos. Las técnicas de imagen, sin embargo, permiten una evaluación precisa del crecimiento tumoral y a tiempo real en animales de laboratorio, lo que disminuye de forma considerable el número de sujetos requeridos.

La tomografía por emisión de positrones, TEP o PET (por las siglas en inglés de Positron Emission Tomography) es una técnica propia de una especialidad médica llamada medicina nuclear y de la radiología, al combinar imágenes de TAC (ejemplos de imágenes 3D). Se trata de una técnica no invasiva de diagnóstico e investigación por imagen capaz de medir la actividad metabólica de los diferentes tejidos del cuerpo humano, especialmente del sistema nervioso central. Al igual que el resto de técnicas diagnósticas en Medicina Nuclear, la TEP se basa en detectar y analizar la distribución que adopta en el interior del cuerpo un radioisótopo administrado a través de una inyección. La TEP permite, por ejemplo, localizar los focos de crecimiento celular anormal en todo el organismo, en un solo estudio e independientemente de la localización anatómica donde se presente la neoplasia (primaria o metastásica), ya que la TEP no evalúa la morfología de los tejidos, sino su metabolismo. Por tanto, se ha implantado con mucha fuerza como técnica diagnóstica en oncología, además de otras áreas, como son la cardiología, la neurología y la psicobiología, dada la posibilidad de cuantificar el metabolismo tanto cardiaco como en el sistema nervioso central.

La técnica de fluorescencia es una técnica de imagen que permite estudiar las propiedades de sustancias orgánicas o inorgánicas utilizando el fenómeno de fluorescencia. En la mayoría de los casos, se marca específicamente un componente de interés en la muestra, con una molécula fluorescente llamada fluoróforo. La muestra se ilumina con luz de una determinada/s longitud/es de onda, que es absorbida por los fluoróforos, originando una emisión de luz a longitudes de onda mayores (o a diferente color que la luz absorbida). La cantidad y la longitud de onda de la energía emitida dependen del fluoróforo y del entorno químico del fluoróforo. Entre los fluoróforos más comúnmente utilizados se encuentran la fluoresceína isotiocianato (FITC), los derivados de la rodamina (TRITC), comarina y cianina, los fluoróforos “Alexa Fluor” y “DyLight Fluor”, la familia de la cianina (e.g., Cy3, Cy5 y Cy7).

La técnica de imagen por fluorescencia *in vivo* es igual que la microscopía de fluorescencia, difiere únicamente en que trabaja a nivel macroscópico. Los objetos para imagen por fluorescencia son el cuerpo completo de (pequeños) animales. Moléculas que absorben en la región del infrarrojo cercano (NIR), 700-1.000 nm, pueden ser utilizadas para visualizar e investigar dianas moleculares *in vivo*, ya que la mayoría de los tejidos generan poca fluorescencia NIR. Los fluoróforos orgánicos NIR más comunes son las polimetinas (e.g., pentametina y heptametina). Las sondas utilizadas para imagen por fluorescencia *in vivo* pueden ser dirigidas o no dirigidas. Las dirigidas tienen la ventaja de que se pueden dirigir específicamente a un tejido diana. De esta manera, las sondas se unen a sus dianas, mientras que las no unidas se eliminan de la circulación. Esta aproximación es muy útil para realizar imágenes de tumores *in vivo*, ya que en cáncer, normalmente se sobreexpresan ciertos receptores de superficie. Un ejemplo de sondas dirigidas pueden ser moléculas de anticuerpos conjugadas con cianinas o “quantum dots”. También se pueden utilizar moléculas más pequeñas dirigidas, en lugar de anticuerpos, por ejemplo ácido fólico conjugado con un fluorocromo NIR que proporciona imágenes de macrófagos activados implicados en enfermedades inflamatorias de articulaciones. Dichas moléculas irían dirigidas al receptor de ácido fólico. Dentro del grupo de las sondas dirigidas, los anticuerpos presentan la ventaja de su rápido aislamiento y que tienen una alta afinidad por virtualmente, cualquier antígeno.

Por otra parte, diferentes ensayos sistemáticos *in vivo* han proporcionado una confirmación de que el tamaño es un parámetro importante en farmacocinética y biodistribución de moléculas de anticuerpos monoclonales. Así, parece ser que moléculas grandes de IgG (150 kDa) que reconocen antígenos de superficie expresados por las células tumorales penetran en los tumores sólidos muy lentamente, con una distribución no uniforme, y tienen una vida media sérica muy larga [Holliger *et al.* Nature Biotech. 2005; 23: 1126-36]. Por el contrario, pequeños fragmentos de anticuerpo de cadena única (scFv) monovalentes, con un tamaño de 25-30 kDa son mucho más eficientes en la penetración al tumor,

pero son eliminados demasiado rápido y poseen además una pobre retención en el tumor, debido a sus propiedades de unión monovalente.

Un anticuerpo ideal para localizar tumores debería ser una molécula multivalente de tamaño intermedio, que proporcione una penetración más rápida en el tumor, una mayor retención en el tejido diana y una eliminación sanguínea más rápida. Estudios recientes indican que anticuerpos bivalentes, tales como los “diabodies” (60 kDa), pueden ser más apropiados para las técnicas de imagen [Williams *et al.*, 2001; Cancer Biother. Radiopharm.; 16:25-35]. Los “diabodies” son moléculas diméricas no unidas covalentemente, formadas espontáneamente en formato scFv con espaciadores cortos que conectan la región variable de los genes. Debido a su pequeño tamaño, se eliminan rápidamente a través de los riñones, limitando, por tanto, su exposición a la médula ósea, que es frecuentemente el órgano dosis-limitante con los anticuerpos intactos radiomarcados. Moléculas más grandes bivalentes, tales como los “minibodies” (dímeros scFv-CH3) y scFv₂-Fc se pueden acumular en tumores y estos últimos pueden diseñarse con un espectro amplio de vidas medias en suero, modulando la interacción con el receptor FcRn. Los “minibodies” pueden ser ideales para localizar tumores, ya que penetran mejor y tienen una eliminación rápida con lo que consiguen mejores proporciones tumor-sangre que las inmunoglobulinas intactas (150 kDa) o los fragmentos Fab₂ (110 kDa).

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos con estos formatos en varios modelos [Williams *et al.*, 2001; Cancer Biother. Radiopharm.; 16:25-35 y Adams *et al.*, 1998; Br. J. Cancer 77:1405-12], aún existen algunas limitaciones que necesitan ser solucionadas con el fin de obtener las mayores ventajas de la capacidad de localización de estos anticuerpos recombinantes. Una de las limitaciones es su limitada flexibilidad, y, otra, la necesidad de que el segundo antígeno esté orientado de manera precisa en un área estrictamente definida una vez que el anticuerpo se una al primer antígeno. De esta manera, los antígenos unidos deberían encontrarse casi opuestos al “diabody”, y en el caso del “minibody”, en una pequeña área circular, que, en algunos casos impide la unión del segundo antígeno. Esto implica que parte de la afinidad observada depende principalmente de la unión y de la capacidad de volverse a unir (“rebinding”), y no de la unión simultánea a diferentes moléculas del antígeno.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar reactivos para diagnóstico por imagen, basados en anticuerpos, que permitan la detección, visualización o localización de una diana de interés, tal como un antígeno asociado con una alteración patológica, que superen la totalidad o parte de los inconvenientes previamente mencionados.

Compendio de la invención

Los inventores han desarrollado un nuevo formato de anticuerpo, en forma de proteína oligomérica que comprende una pluralidad de proteínas de fusión, comprendiendo cada proteína de fusión un dominio de unión de un anticuerpo o de un fragmento funcionalmente equivalente del mismo, y un dominio de oligomerización, marcada posteriormente con un marcador adecuado para su aplicación en técnicas de diagnóstico por imagen. Dichas proteínas oligoméricas pueden ser utilizadas para detectar, visualizar o localizar una diana de interés, tal como un antígeno asociado con una alteración patológica.

Efectivamente, tal y como se ilustra en el Ejemplo 1, dichas proteínas oligoméricas son agentes efectivos para la localización de depósitos tumorales *in vivo*. En una realización particular, los inventores han generado varias proteínas triméricas, en ocasiones identificadas como “trimerbodies”, una específica frente al hapteno NIP, otra frente al antígeno carcinoembrionario (CEA) humano, y otra que reconoce un epítipo de la laminina asociado a angiogénesis, y las han caracterizado tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha estudiado en detalle su estabilidad, su especificidad y afinidad y sus propiedades de localización tumoral, observándose que todas ellas eran multivalentes y poseían una excelente característica de unión al antígeno, lo que les proporciona una elevada afinidad funcional (avidez). Asimismo, los trimerbodies anti-CEA conjugados químicamente con un marcador fluorescente mostraron una eficiente localización del tumor en un modelo experimental de carcinoma colorrectal humano en ratones y los trimerbodies anti-laminina mostraron una localización excelente en varios tipos de cáncer humano, incluyendo fibrosarcomas y carcinomas. Estos resultados demuestran el potencial de este nuevo formato de anticuerpo para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una proteína oligomérica que comprende una pluralidad de proteínas de fusión, iguales o diferentes, y un marcador (M), en la que cada proteína de fusión comprende:

- (a) un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo; y
- (b) un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de dicha proteína oligomérica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicha proteína oligomérica, en un método para la detección, visualización o localización de una diana. Un método para la detección, visualización o localización de una diana que comprende el empleo de dicha proteína oligomérica constituye un aspecto adicional de esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende dicha proteína oligomérica y un medio apropiado.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende dicha proteína oligomérica y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende dicha proteína oligomérica. El empleo de dicho kit para la detección, visualización o localización de una diana constituye un aspecto adicional de esta invención.

10

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 describe la caracterización molecular de los trimerbodies purificados. (A) Perfil de elución del experimento de filtración en gel de las construcciones L36 [L36 trimerbody (líneas más oscura) y L36 scFv (línea más clara)]. Los volúmenes de exclusión (V_o) y total (V_T) están indicados. Los volúmenes de elución de marcadores de peso molecular seleccionados se indican con flechas, así como sus correspondientes pesos moleculares. Para que quede de manera clara, la absorbancia de ambos cromatogramas se ha escalado y movido de posición en la figura. (B) La funcionalidad de los trimerbodies purificados se demostró por ELISA en placas tapizadas con albúmina sérica bovina (BSA), laminina-1 murina, hapteno NIP conjugados con BSA (NIP₁₀-BSA) y CEA humano; y (C) mediante citometría de flujo en células tumorales CEA-negativas y CEA-positivas. Se muestran control de isotipo (histograma gris), trimerbody anti-CEA (línea sólida) y trimerbody anti-NIP (línea de puntos). (D) Análisis de la interacción del scFv B1.8 y del trimerbody B1.8 a NIP₁₀-BSA utilizando BIAcore. Las curvas muestran los datos obtenidos tras la sustracción de la respuesta de unión a una superficie de referencia tapizada con BSA (1900 UR), para eliminar los efectos de la unión no específica. También se muestran sensogramas representativos que corresponden con las curvas de unión de afinidad ajustadas de los trimerbodies scFv B1.8 y trimerbody B1.8 (dil. 1200 y 800 nM) en buffer HBS-EP inyectado sobre las mismas celdas que anteriormente.

La Figura 2 describe actividades de unión de moléculas de trimerbody mono-específicas y bi-específicas. Se comparan sobrenadantes de células 293T transfectadas con pEGFP-N1, pCR3.1-L36-NC1^{ES-}, ó pCEP4-B1.8-NC1^{ES-} con sobrenadantes de células 293T transfectadas con pCR3.1-L36-NC1^{ES-} y pCEP4-B1.8-NC1^{ES-}, utilizando ELISA directo (A), usando placas tapizadas con BSA, conjugados NIP₁₀-BSA y laminina-1, y por ELISA sándwich (B) utilizando placas tapizadas con laminina.

La Figura 3 describe la estabilidad de las moléculas de trimerbody en suero. Los trimerbodies L36 purificados se incubaron en suero humano o de ratón a 37°C, tal y como se detalla en el Ejemplo 1 (materiales y métodos) y la funcionalidad de las mezclas de reacción se analizaron por ELISA.

La Figura 4 describe la localización de anticuerpos conjugados con un fluoróforo (cianina 5; Cy5) en un modelo de cáncer gástrico (CEA-positivo) experimental en ratones desnudos. Imágenes de infrarrojo cercano en ratones desnudos portadores de un carcinoma gástrico MKN45 subcutáneos (s.c.). Imágenes ventral (A, C) y dorsal (B, D) tomadas 3, 24 y 48 h tras la inyección intravenosa (i.v.) con trimerbodies (B1.8, MFE-23 y L36) marcados con Cy5 (A, B), o scFv L36 marcados con Cy5 (C, D). b: bladder, t: tumor.

La Figura 5 describe la localización de trimerbodies conjugados con un fluoróforo (cianina 5; Cy5) en varios modelos de cáncer humano (CEA-negativo) experimental en ratones desnudos. Imágenes de infrarrojo cercano de ratones desnudos portadores de fibrosarcomas HT1080 humanos s.c. (A) o carcinomas de cervix (HeLa) humanos s.c. (B). Las imágenes fueron tomadas 3, 24 y 48 h tras la inyección intravenosa (i.v.) con trimerbodies marcados con Cy5.

La Figura 6 describe un modelo estructural de trimerbody. Vista lateral (A) y superior (B) del modelo molecular del trimerbody de anti-laminina L36.

Descripción detallada de la invención

55

Definiciones

Tal como aquí se utiliza, el término “diana” incluye una parte de una macromolécula que es reconocida por un anticuerpo; en una realización particular, dicha diana es un epítipo o determinante antigénico de un antígeno.

60

Un “antígeno”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una sustancia que induce la generación de anticuerpos y puede generar una respuesta inmune. Los antígenos, habitualmente, son proteínas o polisacáridos, e incluyen partes de células, bacterias, virus y otros microorganismos. Atendiendo a su origen, un antígeno puede ser (i) exógeno, es decir, un antígeno que ha entrado en el cuerpo de un sujeto desde el exterior, por ejemplo, mediante inhalación, ingestión, inyección, etc.; (ii) endógeno, es decir, un antígeno generado en el interior celular como resultado del metabolismo celular normal o debido a una infección intracelular, e.g., bacteriana, vírica, etc., incluyendo antígenos xenogénicos (heterólogos), autólogos e idiomáticos o alogénicos (homólogos); o (iii) autoantígeno, es decir, una proteína (o un complejo de proteínas) normal que es reconocida por el sistema inmune de un sujeto que padece una enferme-

65

dad autoinmune. Una clase especialmente importante de antígenos tumorales (o neoantígenos), es decir, antígenos que son presentados por moléculas del complejo mayoritario de histocompatibilidad de tipo I (MHC I) o de tipo II (MHC II) sobre la superficie de células tumorales; cuando dichos antígenos tumorales son presentados únicamente por células tumorales pero no por células normales se denominan “antígenos específicos de tumor” (TSA, del inglés “tumor-specific antigen”) y, en general, proceden de una mutación específica del tumor; alternativamente, los antígenos tumorales que son presentados tanto por células tumorales como por células normales se denominan “antígenos asociados a tumor” (TAA, del inglés “tumor-associated antigen”) y, en general, proceden de una mutación específica del tumor.

El término “anticuerpo”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una inmunoglobulina, o a un fragmento de la misma, con capacidad de unión a un antígeno e incluye todo tipo de anticuerpos, e.g., anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, etc., así como fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos Fv de cadena única (scFv, del inglés single chain Fv), anticuerpos monodominio (V_{HH}), diabodies, etc. En una realización particular de la invención, dicho anticuerpo es un fragmento de un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab', scFv o V_{HH}, los cuales pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. En una realización particular y preferida, el anticuerpo es un scFv.

Un fragmento “Fv” es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Esta región está formada por un dominio variable de una cadena pesada (VH) y un dominio variable de una cadena ligera (VL) asociados no covalentemente.

Los fragmentos “scFv” comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, formando una cadena polipeptídica única (VH-VL). Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un polipéptido conector (linker) entre los dominios VH y VL (VH-linker-VL) que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Información adicional sobre scFv puede encontrarse en “The Pharmacology of Monoclonal Antibodies”, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., págs. 269-315(1994).

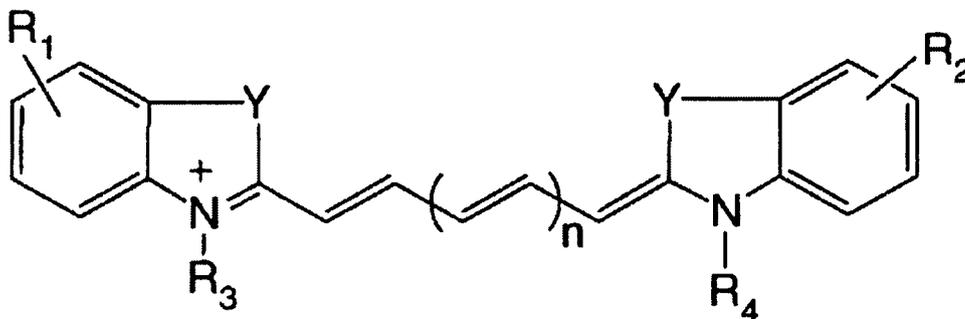
El término “diabodies” se refiere a un fragmento de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo una VH conectada a una VL en la misma cadena polipeptídica (VH-linker-VL). Mediante el uso de un conector que sea demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena, y crear dos sitios de unión al antígeno.

El término “V_{HH}”, tal como aquí se utiliza se refiere anticuerpos monodominio [Nguyen *et al.*, Adv. Immunol. (2001), 79:261-96.; Nguyen *et al.*, Embo J. (2000), 19 (5):921-30.; Sheriff & Constantine, Nat. Struct. Biol. (1996), 3 (9):733-6). En especies de camélidos (camellos, dromedarios, llamas, etc.) una parte de sus anticuerpos carece de cadena ligera, estando la zona de reconocimiento de los antígenos constituida únicamente por el dominio VH [Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. (2002), 277 (26):23645-50]. Este dominio VH se diferencia de los dominios VH de otros anticuerpos en que sus zonas de reconocimiento del antígeno están formadas por bucles de mayor tamaño. Así, a los dominios VH de anticuerpos de camélidos se les denomina V_{HH}. Este dominio (V_{HH}) de aproximadamente 15 kDa puede expresarse en el periplasma de *E. coli* manteniendo la capacidad de unión a su antígeno. Los V_{HH} son moléculas más estables que los scFv, y al contrario que éstos raramente agregan. Al igual que los dominios VL y VH de ratón, los dominios V_{HH} poseen un enlace S-S intramolecular que estabiliza su estructura terciaria y es necesario para su correcto plegamiento [Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. (2002), 277 (26):23645-50].

El término “marcador”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier tipo de molécula que indica la existencia de un proceso químico, físico o biológico, que se puede introducir en un organismo con el fin de examinar alguna propiedad. Los marcajes pueden ser radiactivos o no radiactivos. El marcaje radiactivo o isotópico se ha empleado con más frecuencia, aunque va siendo desplazado progresivamente por los métodos no radiactivos. Aunque no existe consenso acerca del marcaje ideal, en la mayoría de los casos se hace con ³²P. Puesto que la corta vida media de este isótopo (14 días) crea dificultades en la preparación, comercialización y uso rutinario de los ensayos, se utilizan también otras alternativas (³⁵S, ³H, ¹²⁵I, ¹⁴C, etc.). En cuanto a los marcadores no radiactivos, en función del marcador empleado, la detección se hace por fluorometría o añadiendo un sustrato específico cuya transformación enzimática por la enzima marcadora puede detectarse por alguno de los siguientes principios: (i) espectrofotometría: medida de la absorción de luz por los productos de la reacción, bien solubles o insolubles, en el ultravioleta o el visible (colorimetría), (ii) fluorometría: medida de la luz emitida por productos de la reacción que poseen un molécula fluorescente, o (iii) quimioluminiscencia: medida de luz emitida como consecuencia de reacciones con esta característica. Estos y otros procedimientos se pueden aplicar a la detección de proteínas, antígenos o pequeños ligandos.

En concreto, la fluorometría se puede utilizar para marcaje *in vivo*. De esta manera, se puede marcar específicamente un componente de interés en una muestra, con una molécula fluorescente, llamada fluoróforo. Uno de los fluoróforos más comúnmente utilizados es la fluoresceína isotiocianato (FITC), un reactivo derivado de la fluoresceína, que se acopla químicamente a otras moléculas para crear nuevas moléculas fluorescentes para una variedad de aplicaciones. Otros fluoróforos históricamente muy utilizados son los derivados de la rodamina (TRITC), comarina y cianina. Nuevas generaciones de fluoróforos incluyen el “Alexa Fluor” y los “DyLight Fluor”, más fotoestables, más brillantes y menos sensibles a cambios de pH que otros marcadores conocidos. Dentro de la familia de la cianina, se incluyen los marcadores Cy3, Cy5, Cy5.5 y Cy7, que son reactivos fluorescentes solubles en agua. Los marcadores Cy3 son amarillo-naranja (excitación a 550 nm aproximadamente, emisión a aproximadamente 570 nm), mientras que los Cy5 son fluorescentes en la región del rojo (aproximadamente a 650/670 nm). Normalmente son sintetizados con

grupos reactivos en una o en ambas cadenas laterales de nitrógeno, de manera que pueden ser acoplados químicamente, tanto a ácidos nucleicos como a proteínas, siendo ampliamente usados en técnicas de diagnóstico por imagen. Por otra parte, dentro de los fluoróforos orgánicos para el infrarrojo cercano (NIR), los más comunes son las polimetinas de fórmula general (I)



(I)

donde

R_1 y R_2 , independientemente entre sí, representan alquilo C_1 - C_{10} , sulfoalquilo C_1 - C_{10} , cicloalquilo C_3 - C_{10} , alcoxilo C_1 - C_{10} , o arilo;

R_3 y R_4 , independientemente entre sí, representan sulfoalquilo C_1 - C_{10} , haloalquilo C_1 - C_{10} , o hidroxicarbonilalquilo C_1 - C_{10} ;

Y es C, O, S; y

n es un número entero comprendido entre 1 y 10.

Entre las polimetinas más útiles se encuentran las cianinas pentametina ($n = 1$) y heptametina ($n = 2$) que comprenden un grupo benzoxazol, benzotiazol, indolil, 2-quinolin ó 4-quinolin.

Proteína oligomérica de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína oligomérica, en adelante proteína oligomérica de la invención, que comprende una pluralidad de proteínas de fusión, iguales o diferentes, y un marcador (M), en la que cada proteína de fusión comprende:

- (a) un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo; y
- (b) un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización.

El *marcador (M)* presente en dicha proteína oligomérica de la invención puede ser prácticamente cualquier marcador; no obstante, para sus aplicaciones en técnicas de diagnóstico por imagen dicho marcador (M) es un marcador adecuado para dichas técnicas, por ejemplo, (i) un fluoróforo, tal como un fluoróforo para diagnóstico por imagen por fluorescencia en la zona cercana al infrarrojo, e.g. Cy5, Cy7 etc.; (ii) un radionucleido para radioinmunoescintigrafía [compuestos que emiten partículas gamma: ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{131}I , renio 186 (^{186}Re)] o para tomografía por emisión de positrones (TEP) (marcador TEP); etc. En una realización particular, dicho marcador (M) es un fluoróforo, tal como Cy5, Cy7, etc., o un marcador TEP, tal como ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{18}F , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr , ^{124}I , etc.

En general, el uso en clínica humana de anticuerpos recombinantes con fines diagnóstico requiere el empleo de marcadores tipo TEP ("inmuno-TEP"), los cuales, por sus características, permitirán detectar lesiones pequeñas, incluyendo micrometástasis, localizadas en zonas profundas; alternativamente, para detectar lesiones más superficiales, se podrían utilizar fluoróforos, e.g., marcadores fluorescentes NIR, en localizaciones más accesibles, por ejemplo, piel, fondo de ojo, etc. [Wu & Olafsen. *Cancer J.* (2008). May-Jun; 14(3):191-7; van Dongen GA *et al.* (2007). *Oncologist.* Dec; 12(12):1379-89.

La proteína oligomérica de la invención comprende una pluralidad de proteínas de fusión, iguales o diferentes, y un marcador (M), comprendiendo cada una de dichas proteínas de fusión comprende un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo; y un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización.

En una realización particular, dicha proteína oligomérica de la invención comprende una pluralidad de proteínas de fusión iguales; en cuyo caso, cada una de dichas proteínas de fusión comprende un mismo polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo; y un mismo polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización.

En otra realización particular, dicha proteína oligomérica de la invención comprende una pluralidad de proteínas de fusión diferentes, por ejemplo, dos o más proteínas de fusión diferentes. En este caso, una de dichas proteínas de fusión comprende un polipéptido (A1) que comprende un anticuerpo (1) o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo (1); y un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización, y otra de dichas proteínas de fusión comprende un polipéptido (A2) que comprende un anticuerpo (2) o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo (2); y un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización, en donde dichos anticuerpos (1) y (2) son diferentes. El número total de proteínas de fusión presentes en la proteína oligomérica de la invención dependerá del dominio de oligomerización, dependiendo del dominio de oligomerización siendo posible prácticamente cualquier combinación entre dichas proteínas de fusión iguales o diferentes, siempre y cuando el dominio de oligomerización se mantenga. El hecho de que la proteína oligomérica de la invención comprenda dos o más proteínas de fusión diferentes permite reconocer e interactuar con dos o más dianas (e.g., antígenos) diferentes.

A modo ilustrativo, no limitativo, la proteína oligomérica de la invención puede contener dos proteínas de fusión diferentes entre sí, tal como se ha mencionado previamente; o, alternativamente, dos proteínas de fusión iguales entre sí y una proteína de fusión diferente; o, alternativamente, dos proteínas de fusión iguales entre sí y otros dos proteínas de fusión diferentes pero iguales entre sí; o, alternativamente, dos proteínas de fusión iguales entre sí y otros dos proteínas de fusión diferentes entre sí y diferentes a las dos proteínas de fusión iguales; o, alternativamente, tres proteínas de fusión diferentes entre sí; etc.; en general, cualquier combinación de proteínas de fusión que comprendan un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo, y un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización, en las que se mantenga dicho dominio de oligomerización.

La proteína oligomérica de la invención comprende dos o más proteínas de fusión, iguales o diferentes; por tanto, puede reconocer e interactuar con una única diana (antígeno), o, alternativamente, con dos o más dianas (e.g., antígenos) diferentes, lo que la convierte en un reactivo muy versátil monoespecífico (es decir, cuando reconoce a una única diana o antígeno), o multiespecífico (es decir, cuando reconoce a más de una diana o antígeno, e.g., biespecífico, si reconoce dos dianas o antígenos diferentes, trispecíficos, si reconoce tres dianas o antígenos diferentes, etc.

El *polipéptido (A)* comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo. Dicho anticuerpo, o fragmento funcionalmente equivalente, reconoce una diana, tal como un epítipo o determinante antigénico de un antígeno; en una realización particular, dicho antígeno es un antígeno tumoral, tal como CEA (Begent RH *et al.* Nat Med. (1996) Sep; 2(9):979-84), o un antígeno no tumoral que se expresa en áreas de angiogénesis activas en el microambiente peritumoral, tal como el dominio EDB de la fibronectina (Ebbinghaus C *et al.* Curr Pharm Des. (2004); 10(13): 153 7-49).

En una realización particular, el polipéptido (A) comprende un anticuerpo que reconoce una diana o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo que reconoce dicha diana. Prácticamente cualquier anticuerpo, o fragmento funcionalmente equivalente del mismo, que reconozca una diana puede ser utilizado en la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (AcM) o un anticuerpo policlonal (AcP); alternativamente, dicho polipéptido (A) puede contener un fragmento funcionalmente equivalente de un anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo que mantiene la capacidad de reconocimiento de la diana reconocida por el anticuerpo completo del que deriva, e.g., un scFv, un anticuerpo biespecífico o *diabody* que reconoce dicha diana o bien en su formato recombinante completo (Fab + Fc), o un anticuerpo monodominio V_{HH} preferentemente, un scFv (Ejemplo 1).

En una realización particular, el polipéptido (A) comprende un anticuerpo que reconoce una diana o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo que reconoce dicha diana. Prácticamente cualquier anticuerpo, o fragmento funcionalmente equivalente del mismo, que reconozca una diana puede ser utilizado en la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal AcM o policlonal AcP; alternativamente, dicho polipéptido (A) puede contener un fragmento funcionalmente equivalente de un anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo que mantiene la capacidad de reconocimiento de la diana reconocida por el anticuerpo completo del que deriva, e.g., un scFv, un anticuerpo biespecífico o *diabody* que reconoce dicha diana o bien en su formato recombinante completo (Fab + Fc), preferentemente, un scFv (Ejemplo 1).

En una realización particular, dicho polipéptido (A) comprende un scFv recombinante derivado del AcM L36 anti-laminina (Ejemplo 1) [scFv L36] que contiene la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal L36 fusionada, a través de un espaciador, tal como un péptido que comprende la secuencia (Gly-Ser)₄ (o una secuencia de tipo Gly-Ser-Pro-Gly, o bien comprende la secuencia Leu-Glu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser), a la región variable de la cadena ligera (VL) del AcM L36 y cuya secuencia ya ha sido descrita [Sanz L *et al.* Cancer Immunology and Immunotherapy, 2001 Dec; 50(10)557-65], en donde el extremo 3' de

ES 2 371 426 A1

la secuencia codificante de VH está unido al extremo 5' de la secuencia codificante de dicho linker y el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos codificante de dicho linker está unido al extremo 5' de la secuencia codificante de VL. El AcM L36 reconoce lamininas de diferentes especies de animales, por ejemplo, de ratón, rata, humanos, etc., ya que interactúa con una región que está muy conservada entre diferentes especies de animales [Sanz L *et al.* EMBO J 2003, Vol. 22(7): 1508-1517].

En otra realización particular, dicho polipéptido (A) comprende un scFv recombinante derivado del AcM B1.8 específico del hapteno NIP (Ejemplo 1) que contiene la región variable de la cadena pesada (VH) del AcM B1.8 fusionada, a través de un espaciador, a la región variable de la cadena ligera (VL) del AcM B1.8; en una realización particular, dicho espaciador comprende una secuencia de tipo Gly-Ser-Pro-Gly, o de tipo (Gly-Ser)₄, o bien comprende la secuencia Leu-Glu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser.

En otra realización particular, dicho polipéptido (A) comprende un scFv recombinante derivado del AcM MFE23 específico del antígeno carcinoembrionario (CEA) humano (Ejemplo 1) que contiene la región variable de la cadena pesada (VH) del AcM MFE23 fusionada, a través de un espaciador, a la región variable de la cadena ligera (VL) del AcM MFE23; en una realización particular, dicho espaciador comprende una secuencia de tipo Gly-Ser-Pro-Gly, o de tipo (Gly-Ser)₄, o bien comprende la secuencia Leu-Glu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser.

Dicho polipéptido (A) puede reconocer y unirse a una diana, e.g., presente en un antígeno tumoral, y, como resultado de esa unión, localizar la diana (antígeno) y permitir su visualización mediante técnicas de imagen apropiadas (e.g., fluorescencia, TEP, etc.) debido a la presencia del marcador (M) en la proteína oligomérica de la invención.

El *polipéptido (B)* comprende un dominio de oligomerización. Dicho dominio de oligomerización puede ser prácticamente cualquier dominio que permite la formación de oligómeros, por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, etc., de péptidos o proteínas, susceptible de ser expresado de forma recombinante y de formar un oligómero proteico de la proteína que lo comprende. No obstante, en una realización particular, dicho dominio de oligomerización es un dominio de trimerización, tal como el dominio de trimerización del dominio NC1 de colágeno XVIII o del colágeno XV de mamífero. Como es conocido, dicho dominio NC1 del colágeno XVIII (y del colágeno XV) comprende un dominio de trimerización y el dominio endostatina (ES) unidos por unos péptidos bisagra. Por tanto, en una realización particular, la proteína de fusión presente en la proteína oligomérica de la invención comprende un polipéptido (B) que comprende el dominio NC1 del colágeno XV o el dominio NC1 del colágeno XVIII que contiene el dominio de trimerización pero al que se le ha eliminado el dominio de ES (NC1^{ES-}) así como la totalidad o parte de los péptidos bisagras existentes entre dichos dominios. Las secuencias de dichos dominios NC1 de colágeno XV y de colágeno XVIII son conocidas; a modo ilustrativo, la secuencia del dominio NC1 del colágeno XVIII ha sido descrita previamente por Sasaki *et al.* [Sasaki *et al.* Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. EMBO J. 1998 Aug 3; 17(15):4249-56].

Por tanto, a modo ilustrativo, en una realización particular, la invención proporciona una proteína oligomérica de la invención que comprende un marcador (M) y una pluralidad de proteínas de fusión, iguales o diferentes, en donde cada proteína de fusión comprende:

- (i) un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo; y
- (ii) un polipéptido (B) que comprende el dominio NC1^{ES-} de colágeno XVIII de mamífero.

No obstante, cualquier otro dominio similar al dominio NC1 de colágeno XVIII que comprenda un dominio de oligomerización puede ser utilizado en la puesta en práctica de la presente invención, con el fin de generar la proteína oligomérica de la invención.

Debido a la presencia del dominio de oligomerización en la proteína de fusión presente en la proteína oligomérica de la invención, la proteína oligomérica de la invención puede estar constituida por 2 ó más, por ejemplo, 3, 4, 5, o más proteínas de fusión, iguales o diferentes entre sí, dando lugar a dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, etc. de las proteínas de fusión proporcionadas por esta invención. En una realización particular, dicha proteína oligomérica de la invención es un trímero y comprende 3 proteínas de fusión proporcionadas por esta invención; dado que dichas proteínas de fusión incorporan un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo, dichos trímeros han sido denominados por los inventores con el nombre genérico de "trimerbody" (singular) o "trimerbodies" (plural). En una realización más concreta, dicha proteína oligomérica de la invención es un trímero y comprende 3 proteínas de fusión iguales proporcionadas por esta invención; en otra realización más concreta, dicha proteína oligomérica de la invención es un trímero y comprende 3 proteínas de fusión proporcionadas por esta invención, de las cuales dos son iguales entre sí y la otra es diferente; y, en otra realización más concreta, dicha proteína oligomérica de la invención es un trímero y comprende 3 proteínas de fusión diferentes proporcionadas por esta invención.

La proteína de fusión proporcionada por esta invención puede contener, además, si se desea, un tercer polipéptido (C) que comprende la secuencia de aminoácidos de un péptido de unión flexible entre dichos polipéptidos (A) y (B) y/o un péptido (D) para facilitar el aislamiento o purificación de la proteína de fusión.

Dicho polipéptido (C) puede comprender prácticamente cualquier secuencia peptídica que defina un péptido de unión flexible. Ejemplos ilustrativos de péptidos de unión flexibles incluyen secuencias de tipo Gly-Ser-Pro-Gly o la secuencia (Gly-Ser)₄. No obstante, en una realización particular, dicho péptido de unión flexible comprende la secuencia Leu-Glu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser. Asimismo, con el fin de facilitar el aislamiento y purificación de la proteína de fusión de la invención, dicha proteína de fusión puede contener, si se desea, un péptido (D) susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación de la proteína de fusión, tal como un péptido etiqueta (“tag”). Dicho péptido (D) puede estar situado en cualquier posición de la proteína de fusión que no altere la funcionalidad de ninguno de los polipéptidos (A) y (B); a modo ilustrativo, no limitativo, dicho péptido (D) puede estar situado a continuación del polipéptido (B). Prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o purificación de la proteína de fusión puede ser utilizado, por ejemplo, secuencias de polihistidina, secuencias peptídicas susceptibles de ser reconocidas por anticuerpos que pueden servir para purificar la proteína de fusión; resultante por cromatografía de inmunoafinidad, tales como péptidos etiqueta, por ejemplo, epítomos derivados de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, C-myc, FLAG, V5, etc.

La proteína oligomérica de la invención puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende poner en contacto una proteína oligomérica que comprende una pluralidad de proteínas de fusión, en la que cada proteína de fusión comprende:

- (i) un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo; y
- (ii) un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización,

con un marcador (M) bajo condiciones que permiten la unión de dicho marcador (M) a la proteína oligomérica. Dicho procedimiento constituye un aspecto adicional de esta invención.

Las características de dichos polipéptidos (A) y (B) así como las del marcador (M) ya han sido definidas previamente. Las condiciones que permiten la unión de dicho marcador (M) a dicha proteína oligomérica dependen del marcador (M) elegido y de la proteína oligomérica y, en general, son conocidas por los técnicos en la materia.

La proteína oligomérica de la invención, debido a sus características propias, puede ser utilizada en numerosas aplicaciones, por ejemplo, en la visualización de antígenos mediante técnicas de imagen, tanto *in vitro* como *in vivo* (e.g., fluorescencia, TEP, etc.), en la localización de antígenos, etc., en general, en la identificación de alteraciones patológicas asociadas con la neoexpresión o sobreexpresión de antígenos, e.g., patologías inflamatorias (e.g., integritas, etc.), patologías vasculares (e.g., placas de ateroma, etc.), patologías tumorales, etc. En una realización particular, dichos antígenos son antígenos tumorales.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una proteína oligomérica de la invención, en un método para la detección, visualización o localización de una diana, tal como un antígeno, mediante una técnica apropiada, por ejemplo, una técnica de imagen. En una realización particular dicha diana es un antígeno que se expresa *de novo* (es decir, que en condiciones normales no se expresa pero que en una alteración patológica se expresa) o sobreexpresa (es decir, que en condiciones normales se expresa en un nivel basal y su expresión aumenta en caso de una alteración patológica), por ejemplo, en patologías inflamatorias, vasculares, tumorales, etc. En una realización particular, dicha diana es un antígeno tumoral.

Alternativamente, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección, visualización o localización de una diana, tal como un antígeno, mediante una técnica apropiada, por ejemplo, una técnica de imagen, que comprende el empleo de una proteína oligomérica de la invención. En una realización particular dicha diana es un antígeno que se expresa *de novo* o se sobreexpresa en una alteración patológica, por ejemplo, en patologías inflamatorias, vasculares, tumorales, etc. En una realización particular, dicha diana es un antígeno tumoral.

Para su empleo en dichas aplicaciones, la proteína oligomérica de la invención se encontrará en un medio apropiado y adecuado para su administración.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende una proteína oligomérica de la invención junto con, al menos, un medio apropiado, tal como un medio que no altera a la estabilidad de dicha proteína oligomérica de la invención, por ejemplo, PBS, solución salina fisiológica, etc. Alternativamente, dicha proteína oligomérica de la invención puede encontrarse en un medio constituido por un sistema de suministro y liberación de compuestos, por ejemplo, un vector viral o no viral (e.g., nanopartículas a base de polímeros biocompatibles, liposomas, etc.). Dichos vectores son, en general, conocidos por los técnicos en la materia.

Para sus aplicaciones *in vivo*, dicho medio debe ser farmacéuticamente aceptable. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una proteína oligomérica de la invención junto con, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, al menos, una proteína oligomérica de la invención en una cantidad eficaz. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de proteína oligomérica de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la proteína oligomérica, la diana (antígeno) a visualizar o localizar, etc.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier forma de administración apropiada, por ejemplo, por vía parenteral. Los vehículos que pueden utilizarse en la elaboración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención dependerán, entre otras cosas, de la forma de administración de dicha composición farmacéutica. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

Las proteínas oligoméricas de la invención pueden aislarse y, si se desea, purificarse, fácilmente, por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. En general, la proteína oligomérica de la invención es oligomérica en solución y posee una excelente estabilidad y capacidad de unión a la diana (antígeno), reconociendo con alta eficiencia tanto antígenos purificados inmovilizados sobre una placa como antígenos expresados o sobreexpresados en alteraciones patológicas (e.g., en la superficie de una célula tumoral). Las proteínas oligoméricas de la invención poseen una señal de unión mayor que el anticuerpo monomérico (que constituye una unidad estructural de la misma) y, aparentemente, una disociación menor, consistente con la unión multivalente al antígeno. De hecho, se ha calculado que una proteína oligomérica de la invención (e.g., la proteína oligomérica anti-NIP - Ejemplo 1) tiene una afinidad funcional por el antígeno muy superior (NIP-BSA) unas 100 veces mayor que su versión monovalente. Este resultado sugiere, aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, que esta ganancia de afinidad podría ser debida al efecto de avidéz de un segundo sitio de combinación en la molécula de la proteína oligomérica de la invención. La presencia de al menos dos sitios de unión funcionales en una sola molécula de una proteína oligomérica de la invención ha sido posteriormente demostrada mediante la generación de proteínas de oligoméricas de la invención biespecíficas (Ejemplos 1); efectivamente, proteínas oligoméricas (trimerbodies) biespecíficas anti-laminina y anti-NIP estables fueron fácilmente producidos por co-expresión de dos construcciones diferentes de proteínas oligoméricas de la invención en células humanas.

Esta ganancia en afinidad a través de la avidéz convierte a las proteínas oligoméricas de la invención en unos reactivos muy atractivos para técnicas de imagen *in vivo* como agentes alternativos, y preferidos, a los anticuerpos diméricos (diabodies y minibodies). Como es conocido, para una completa avidéz en anticuerpos multivalentes dirigidos a moléculas unidas a la superficie, los sitios de unión del antígeno deben apuntar hacia la misma dirección; si la unión múltiple simultánea no es posible estéricamente, entonces la ganancia aparente en afinidad funcional es probable que sea menor y debida únicamente al efecto de unión aumentado, que es dependiente en tasas de difusión y la concentración del antígeno de superficie. El análisis del modelo de las proteínas oligoméricas de la invención, en particular en su formato trimérico (trimerbody), sugiere una estructura con forma de trípode con los dominios scFv orientados hacia fuera. La flexibilidad entre los sitios de unión al antígeno es otro aspecto importante en el diseño de anticuerpos multivalentes, requeridos para el entrecruzamiento de receptores de superficie, bien en la misma célula o en adyacentes. En este sentido, el espaciador flexible presente en algunas realizaciones particulares de esta invención permite numerosas geometrías de unión. Cuando una interacción antígeno-anticuerpo ocurre, la posibilidad de establecer una segunda interacción depende de la valencia, orientación y flexibilidad del sitio de unión del antígeno. Según los cálculos de los inventores, en una molécula de una proteína oligomérica de la invención, tal como un trímero (trimerbody), los scFv que permanecen sin interactuar tienen un área de influencia unas 11 veces mayor, aproximadamente, que otros formatos bivalentes, tales como los diabodies y los minibodies, aumentando la probabilidad de una segunda interacción efectiva. La flexibilidad de las proteínas oligoméricas de la invención constituye también una ventaja frente a otras estructuras más compactas o rígidas de otros formatos (e.g., collabody), ya que aumenta la accesibilidad de los scFv, que es un parámetro crítico para la localización de las dianas *in vivo*.

Por tanto, la multimerización de las construcciones scFv presenta numerosas ventajas para las aplicaciones *in vivo* frente a otros anticuerpos recombinantes (diabodies y minibodies) que han mostrado su potencial como agentes de localización *in vivo*. Las proteínas oligoméricas de la invención son moléculas multivalentes de tamaño intermedio que presentan una alta estabilidad en condiciones fisiológicas. El potencial de dichas proteínas oligoméricas de la invención, en particular de unos trímeros (trimerbodies) para la localización *in vivo* se ha estudiado en modelos experimentales de cáncer humano en ratones desnudos (Ejemplo 1).

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende una proteína oligomérica de la invención. El empleo de dicho kit para la detección, visualización o localización de una diana, e.g., un antígeno, mediante una técnica apropiada, por ejemplo, una técnica de imagen. En una realización particular dicha diana es un antígeno que se expresa *de novo* o se sobreexpresa en una alteración patológica, por ejemplo, en patologías inflamatorias, vasculares, tumorales, etc. En una realización particular, dicha diana es un antígeno tumoral.

El kit de la invención es un producto que contiene los diferentes productos (e.g., proteína oligomérica de la invención, reactivos adicionales, etc.) formando la composición empaquetada de modo que permita su transporte, almacenamiento y su empleo. Los kits de la invención pueden contener de este modo una o más suspensiones, jeringuillas, etc., así como medios para reconstituir la proteína oligomérica de la invención en caso de que esta estuviera en forma liofilizada. Otros componentes que pueden estar presentes en el kit de la invención es un envase que permite mantener las formulaciones de la invención dentro de determinados límites. Los materiales adecuados para preparar tales envases incluyen vidrio, plástico, polietileno, polipropileno, policarbonato y similares, botellas, viales, papel, bolsitas y similares. Adicionalmente, el kit de la invención puede contener instrucciones para su empleo. Dichas instrucciones se pueden encontrar en forma de material impreso o en forma de soporte electrónico que puede almacenar las instruccio-

nes tal que puedan ser leídas por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden adicional o alternativamente contener sitios Web en Internet proporcionando dichas instrucciones.

5 *Proteína de fusión [polipéptido (A)-polipéptido (B)]*

La proteína oligomérica de la invención comprende una pluralidad de proteínas de fusión (iguales o diferentes), dependiendo del dominio de oligomerización presente en el polipéptido (B), y cada proteína de fusión comprende:

- 10 (a) un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo; y
- (b) un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización.

15 Adicionalmente, si se desea, dicha proteína de fusión puede incluir un polipéptido (C) que comprende la secuencia de aminoácidos de un péptido de unión flexible entre dichos polipéptidos (A) y (B) y/o un péptido (D) para facilitar el aislamiento o purificación de la proteína de fusión.

20 Las características de dichos polipéptidos (A), (B), (C) y (D) ya han sido descritas previamente, al igual que la posibilidad de que dichas proteínas de fusión sean iguales o diferentes.

La proteína de fusión proporcionada por la invención puede ser obtenida por métodos convencionales. A modo ilustrativo, dicha proteína de fusión puede obtenerse mediante la fusión de dichos polipéptidos, obtenidos bien por métodos de síntesis química de péptidos o bien mediante la tecnología del ADN recombinante.

Alternativamente, dicha proteína de fusión proporcionada por esta invención puede obtenerse por mediante el empleo de la tecnología del ADN recombinante, para lo cual se generarán las construcciones génicas, cassettes de expresión y vectores correspondientes. En general, cuando las proteínas de fusión son iguales, pueden obtenerse mediante incorporación del ADN que codifica dicha proteína de fusión en una célula huésped apropiada (e.g., bacterias, levaduras, células animales, etc.). Alternativamente, cuando las proteínas de fusión son diferentes, pueden obtenerse, en general, mediante incorporación de los ADN que codifican dichas proteínas de fusión en una célula huésped apropiada, en donde los distintos ADN pueden formar parte de la misma construcción génica o de construcciones génicas diferentes (e.g., mediante co-transformación o co-transfección de células huésped apropiadas).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, en adelante construcción génica de la invención, que comprende, al menos:

- 35 a) una primera secuencia de ácido nucleico (A'), que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (A), en donde dicho polipéptido (A) comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo; y
- 40 b) una segunda secuencia de ácido nucleico (B') que codifica un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización,

45 en donde el extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico (A') está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico (B'), o, alternativamente, el extremo 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico (A') está unido al extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico (B').

50 La *secuencia de ácido nucleico (A')* comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo que reconoce una diana o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo que reconoce dicha diana. Ejemplos ilustrativos de dicha diana incluyen un epítipo o determinante antigénico de un antígeno, por ejemplo, un antígeno que se expresa *de novo* o se sobreexpresa en una alteración patológica, por ejemplo, en patologías inflamatorias, vasculares, tumorales, etc. En una realización particular, dicha diana es un antígeno tumoral.

Por tanto, en una realización particular, la secuencia de ácido nucleico (A') codifica un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo, que reconoce una diana concreta. Prácticamente cualquier anticuerpo, o fragmento funcionalmente equivalente del mismo, que reconozca una diana puede ser utilizado en la presente invención, e.g., un AcM, un AcP, un scFv, un anticuerpo biespecífico o *diabody*, un V_{HH}, etc. En una realización particular, dicha secuencia de ácido nucleico (A') codifica un polipéptido (A) que comprende un scFv recombinante derivado del AcM L36 anti-laminina [scFv L36], o un scFv recombinante derivado del AcM B1.8 específico del hapteno NIP, o un scFv recombinante derivado del AcM MFE23 específico del antígeno carcinoembrionario (CEA) humano (Ejemplo 1).

65 En caso de que la proteína oligomérica de la invención comprenda una pluralidad de proteínas de fusión diferentes, por ejemplo, dos o más proteínas de fusión diferentes, cada una de ellas estaría codificada por la correspondiente secuencia de ADN, las cuales podrían estar en una única construcción génica o en construcciones génicas diferentes.

La *secuencia de ácido nucleico (B')* comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización. Como se ha mencionado previamente, un dominio de oligomerización permite la formación de oligómeros (e.g., dímeros, trímeros, tetrameros, etc., de péptidos o proteínas). Prácticamente cualquier dominio de oligomerización, por ejemplo, un dominio de dimerización, trimerización, tetramerización, etc., presente en distintas proteínas, tanto de origen eucariótico como procariótico, susceptible de ser expresado de forma recombinante y de formar un oligómero proteico de la proteína que lo comprende puede ser utilizado en la presente invención. En una realización particular, dicho dominio de oligomerización es un dominio de trimerización, tal como el dominio de trimerización del dominio NC1 de colágeno XVIII o del colágeno XV; en una realización concreta, dicho dominio de oligomerización es el dominio de trimerización del dominio NC1 de colágeno XVIII o del colágeno XV al que se le ha eliminado la totalidad o parte del dominio de ES. Por tanto, en una realización particular y preferida, la secuencia de ácido nucleico (B') comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio NC1 de colágeno XVIII de mamífero o el dominio NC1 del colágeno XV de mamífero, en el que, opcionalmente, se ha eliminado la totalidad o parte del dominio de ES. Las secuencias de dichos dominios NC1 de colágeno XV y XVIII son conocidas; a modo ilustrativo, la secuencia del dominio NC1 del colágeno XVIII ha sido descrita previamente por Sasaki *et al.* [Sasaki *et al.* Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. EMBO J. 1998 Aug 3; 17(15):4249-56].

En la construcción génica de la invención, el extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico (A') está unido, en una realización particular, al extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (B'); alternativamente, en otra realización particular, el extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (A') está unido al extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico (B').

En general, la secuencia de ácido nucleico (A') no se fusiona directamente a la secuencia de ácido nucleico (B') sino que resulta ventajoso introducir un péptido de unión flexible (o péptido espaciador) entre los polipéptidos codificados por dichas secuencias de ácido nucleico (A') y (B'). Por tanto, si se desea, la construcción génica de la invención también puede contener, además, una tercera *secuencia de ácido nucleico (C')* que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido de unión flexible situada entre dichas secuencias de ácido nucleico (A') y (B'). En una realización particular, el extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (C') está unido al extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico (A') y el extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico (C') está unido al extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (B'); alternativamente, en otra realización particular, el extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico (C') está unido al extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (A') y el extremo 5' de dicha secuencia de ácido nucleico (C') está unido al extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico (B'). Ventajosamente, dicho péptido espaciador (C') es un péptido con flexibilidad estructural. Prácticamente, cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado. A modo ilustrativo, dicho péptido flexible puede contener repeticiones de restos de aminoácidos, en particular de restos de Gly y Ser o cualquier otra repetición de restos de aminoácidos adecuada. Prácticamente cualquier secuencia peptídica que defina un péptido de unión flexible puede ser utilizada en la presente invención. Ejemplos ilustrativos de péptidos de unión flexibles incluyen secuencias de tipo Gly-Ser-Pro-Gly (GSPG) o la secuencia (Gly-Ser)₄. No obstante, en una realización particular, dicho péptido de unión flexible comprende la secuencia Leu-Glu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser. Por tanto, en una realización particular, la construcción génica de la invención comprende, además de dichas secuencias de ácido nucleico (A) y (B) una tercera secuencia de ácido nucleico (C) que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido Leu-Glu-Gly-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser. La longitud y composición del péptido espaciador puede variar; no obstante, en una realización particular, se ajustará (mayor o menor longitud, mayor o menor rigidez) en función de la naturaleza de la diana (antígeno) reconocida por el anticuerpo para conseguir las mejores propiedades funcionales.

Asimismo, con el fin de facilitar el aislamiento y purificación de la proteína de fusión obtenida mediante la presente invención, la construcción génica de la invención puede contener, si se desea, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación de la proteína de fusión. Por tanto, en una realización particular, la construcción génica de la invención incluye, si se desea, una *secuencia de ácido nucleico (D')* que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación, conocido como péptido etiqueta ("tag"). Dicha secuencia de ácido nucleico (D') puede estar situada en cualquier posición que no altere la funcionalidad de ninguno de los polipéptidos [(A) y (B)] expresados por dichas secuencias de ácidos nucleicos (A') y (B'). A modo simplemente ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia de ácido nucleico (D') puede estar situada aguas abajo del extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico (B'). Prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o purificación de la proteína de fusión puede ser utilizado, por ejemplo, una cola de histidinas (e.g., 6 restos de His), una secuencia peptídica susceptible de ser reconocida por un anticuerpo que pueden servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, tales como péptidos etiqueta, etc., por ejemplo, epítopos derivados de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, C-myc, FLAG, V5, etc.

La construcción génica de la invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook *et al.*, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3]. Dicha construcción génica de la invención puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de las secuencias de nucleótidos que codifican para los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico (A') y (B'), constituyendo de este modo un cassette de expresión. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión "operativamente unida" significa que los polipéptidos codificados por

las secuencias de ácido nucleico (A') y (B'), y, en su caso (C'), son expresados en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de expresión.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un cassette de expresión que comprende la construcción génica de la invención operativamente unida a una secuencia de control de expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión proporcionada por esta invención que comprende un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo y un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización. Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de dicha proteína de fusión, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., mientras que en otra realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos eucariotas, por ejemplo, células de insecto, células vegetales, células de mamífero, etc. Ejemplos ilustrativos de promotores que pueden estar presentes en el cassette de expresión proporcionado por esta invención incluyen el promotor de citomegalovirus humano (hCMV), etc.

Ventajosamente, dicho cassette de expresión comprende, además, un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula hospedadora transformada con dicho cassette de expresión. Ejemplos ilustrativos de dichos marcadores que podrían estar presentes en el cassette de expresión de la invención incluyen genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a compuestos tóxicos, y, en general, todos aquellos que permitan seleccionar a las plantas transformadas genéticamente.

La construcción génica de la invención, o el cassette de expresión proporcionado por esta invención, pueden ser insertados en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha construcción de génica de la invención o dicho cassette de expresión. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo ilustrativo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ácido nucleico puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989, citado *supra*]. En una realización particular, dicho vector recombinante es un vector útil para transformar células animales.

Dicho vector puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un vector proporcionado por esta invención. Dicha célula transformada, transfectada o infectada comprende, por tanto, una construcción génica de la invención, o bien dicho cassette de expresión o vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989, citado *supra*]. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transformada, transfectada o infectada con un vector apropiado, siendo dicha célula animal transformada, transfectada o infectada capaz de expresar la proteína de fusión proporcionada por esta invención, por lo que dichos vectores pueden utilizarse para la expresión en células animales de la proteína de fusión proporcionada por esta invención.

La construcción génica de la invención puede ser utilizada para producir dichas proteínas de fusión que comprenden un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo y un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir dicha proteína de fusión proporcionada por esta invención que comprende crecer una célula u organismo proporcionado por esta invención bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína de fusión. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula u organismo dependerán de la célula u organismo utilizado. Si se desea, el método para producir un producto de interés proporcionado por esta invención incluye, además, el aislamiento y purificación de dicha proteína de fusión.

El experto en la materia entenderá que, si la proteína oligomérica de la invención contiene dos o más proteínas de fusión diferentes, dichas proteínas de fusión diferentes pueden expresarse, si se desea, en una célula huésped apropiada mediante co-transformación, co-transfección o co-infección utilizando los vectores que contienen las secuencias codificantes apropiadas.

El siguiente Ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Localización y visualización in vivo de tumores mediante proteínas oligoméricas que comprenden fragmentos de anticuerpos y secuencias derivadas de colágeno

5

I. Materiales y métodos

Anticuerpos y reactivos

10 Los anticuerpos monoclonales (AcMs) utilizados incluyeron el AcM 9E10 (Abcam, Cambridge, R. Unido) específico de c-myc humano, y el AcM NCRC23 (AbD Serotec, Kidlington, R. Unido) específico del antígeno carcinoembrionario (CEA) humano. Los anticuerpos policlonales (AcPs) utilizados incluyeron un anticuerpo (Ac) de conejo anti-albúmina de suero bovina (BSA); un Ac de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP); y un Ac de cabra anti-IgG de ratón, específico del dominio constante de la IgG (Fc), conjugado con HRP, todos ellos proporcionados por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). La laminina-1 purificada a partir del tumor murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) se obtuvo de Becton Dickinson Labware (Bedford, MA, USA). El CEA humano y la BSA fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. Para la generación de conjugados de BSA con el hapteno 4-hidroxi-5-iodo-3-nitrofenil (NIP) (Sigma-Aldrich) en una relación molar 10:1 (NIP₁₀:BSA) se siguió un protocolo anteriormente descrito [Reth, M. *et al.* (1979). *Eur. J. Immunol.* 9:1004-1013].

20

Células y condiciones de cultivo

25 Las células HEK-293 (células epiteliales de riñón embrionario humano; CRL-1573), y sus células derivadas 293T (CRL-11268), así como las células HT-1080 (fibrosarcoma humano; CCL-121), MKN45 (adenocarcinoma gástrico humano; JCRB-0254); y HeLa (carcinoma de cérvix humano; CCL-2) fueron cultivadas en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA), en adelante medio DMEM completo (DCM). Las células HeLa^{CEA} (Compte, M. *et al.* 2007; *Cancer Gene Ther.* 14:380-388) se cultivaron en DCM suplementado con 750 µg/ml de G418 (Invitrogen).

30

Construcción de los vectores de expresión

Los vectores de expresión pCR3.1-L36 y pCR3.1-L36-NC1^{ES-} fueron construidos siguiendo protocolos conocidos [Sanz L *et al.* (2002). *Gene Ther.* 9:1049-1053; Sanz L *et al.* (2001). *Cancer Immunol. Immunother.* 50:557-565].

35

El plásmido pVOM1.C23 que contiene el gen que codifica el Ac MFE-23 (anti-CEA humano) en formato de fragmento variable de cadena única (scFv), fue proporcionado por el Dr. R. E. Hawkins (University of Manchester, UK). El cassette de expresión del Ac MFE-23 se digirió con HindIII y NotI y se clonó en el vector pCEP4.6xHis-myc [Sanz, L. *et al.* (2002). *Gene Ther.* 9:1049-1053] para generar el plásmido pCEP4-MFE-23.

40

El plásmido pCEP4-B1.8 que contiene el gen que codifica el Ac B1.8 (anti-NIP) en formato scFv y las etiquetas (tags) peptídicas de polihistidina (6 His) y c-myc fue construido siguiendo un procedimiento ya descrito [Sanz, L. *et al.* (2002), citado *supra*].

45

Para generar los plásmidos pCEP4-MFE-23-NC1^{ES-} y pCEP4-B1.8-NC1^{ES-} el fragmento de 252 pares de bases (pb) derivado del plásmido pCR3.1-L36-NC1^{ES-}, obtenido por digestión con NotI, se clonó en los plásmidos pCEP4-MFE-23 o pCEP4-B1.8 respectivamente.

Transfecciones celulares y purificación de anticuerpos recombinantes

50

Las células HEK-293 y sus células derivadas 293T fueron transfectadas con Superfect según las recomendaciones del fabricante (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Para la obtención de líneas celulares (transfectantes) estables, las células HEK-293 transfectadas con los vectores pCR3.1-L36 y pCR3.1-L36-NC1^{ES-} respectivamente, se seleccionaron en DCM suplementado con 0,5 mg/ml de neomicina (G418) (Promega). Las células HEK-293 transfectadas con los vectores pCEP4-MFE-23-NC1^{ES-} y pCEP4-B1.8-NC1^{ES-}, respectivamente, se seleccionaron en DCM suplementado con 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen). Los sobrenadantes de las poblaciones celulares transfectadas se analizaron para determinar la expresión de proteínas por ELISA, SDS-PAGE y transferencia Western utilizando el AcM anti-myc. Los transfectantes estables de las células HEK-293 se utilizaron para obtener medio condicionado libre de suero (MCLS) (aproximadamente 1 litro) que fue concentrado (x10) con un filtro de 10.000 MWCO Vivaflow 50 (Vivascience AG, Hannover, Germany), dializado frente a tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,4) y cargado en una columna HisTrap HP de 1 ml utilizando el sistema ÄKTA Prime plus (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Las proteínas (anticuerpos) recombinantes purificadas se dializaron frente a PBS, se analizaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no-reductoras, y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

60

Cromatografía analítica de filtración en gel

65

Los análisis se realizaron utilizando columnas Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) equilibradas con PBS (pH 7,4) en un equipo ÄKTA FPLC (GE Healthcare). Las muestras (100 µl) de proteínas recombinantes purificadas, en una concentración comprendida ente 0,5 y 1,0 mg/ml, se inyectaron en la columna y se eluyeron con una velocidad

de flujo de 0,5 ml/minuto. La columna se calibró con marcadores de peso molecular que comprendían desde 16 kDa hasta 655 kDa (GE Healthcare). El azul dextrano se utilizó como volumen de exclusión.

ELISA

5

La capacidad de reconocimiento y unión de las proteínas recombinantes (trímeros de anticuerpos (scFv) - en ocasiones identificadas en esta descripción como “trimerbodies”) purificadas [L36, MFE23 o B1.8] a laminina-1 minina, CEA humano o conjugados NIP₁₀-BSA, fue estudiada mediante ELISA [Sanz, L. *et al.* 2003; EMBO J., 22:1508-17]. La multivalencia de los trimerbodies se estudió mediante ELISA utilizando el sobrenadante de las células 293T transfectadas bien con un sólo vector (pCR3.1-L36-NC1^{ES-} o pCEP4-B1.8-NC1^{ES-}) o bien con 2 vectores (pCR3.1-L36-NC1^{ES-} y pCEP4-B1.8-NC1^{ES-}). Placas de 96 pocillos Maxisorp (NUNC Brand Products, Roskilde, Dinamarca) fueron recubiertas con laminina (0,5 µg/pocillo) mediante una incubación de 16 horas a 4°C en PBS (10 µg/ml); posteriormente, y, después de lavar las placas con PBS y se bloquearlas con 200 µl de PBS-5% de leche en polvo desnatada, y se añadieron 100 µl de sobrenadante procedente de células 293T transfectadas bien con un sólo vector (pCR3.1-L36-NC1^{ES-} o pCEP4-B1.8-NC1^{ES-}) o bien con 2 vectores (pCR3.1-L36-NC1^{ES-} y pCEP4-B1.8-NC1^{ES-}) durante 1 hora a temperatura ambiente. Al cabo de 3 lavados, se añadieron 100 µl de NIP₁₀-BSA (10 µg/ml), incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, tras 3 lavados, se añadieron 100 µl del Ac de conejo anti-BSA (1:1.000) en 0,05% Tween-20-PBS. Tras tres nuevos lavados, se añadieron 100 µl del Ac de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual, las placas se lavaron y revelaron.

20

Citometría de flujo, detección de antígenos en la superficie celular

La expresión de CEA en las líneas tumorales HeLa y HeLa^{CEA} y la unión de los anticuerpos recombinantes (trimerbodies) se analizó siguiendo un protocolo ya descrito [Blanco B *et al.*, (2003). J. Immunol. 171:1070-1077] mediante inmunofluorescencia indirecta. Brevemente, las células se incubaron con AcM anti-CEA humano (5 µg/ml), o con los trimerbodies purificados (anti-NIP o anti-CEA, 10 µg/ml) y el AcM 9E10 (4 µg/ml) en 100 µl durante 45 minutos. Tras lavado, las células fueron tratadas con las diluciones apropiadas de Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma-Aldrich). Los estudios se realizaron en un citómetro EPICS XL (Coulter Electronics).

30

Estudios de afinidad mediante resonancia de plasmón superficie

Todos los estudios de afinidad mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR, del inglés “Surface Plasmón Resonance”) se realizaron a temperatura ambiente utilizando un sistema Biacore 3000 (GE Healthcare). Se utilizaron chips sensores de dextrano carboximetilado (CM5) (GE Healthcare) y tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M; pH 7,4; NaCl 0,15 M; EDTA 3 mM; Surfactante P20 0,005%) previamente filtrado a través de un filtro de 0,22 µm y desgasificado antes de su uso. Las proteínas recombinantes (trimerbodies) se disolvieron en acetato sódico 10 mM (pH 4,5). El conjugado NIP₁₀-BSA se inmovilizó directamente sobre la superficie del chip sensor siguiendo las instrucciones del fabricante en celdas de flujo independiente a, aproximadamente, 100, 1.800 y 8.500 unidades de resonancia (UR). La BSA, utilizada como control negativo de la interacción, se inmovilizó a 1.900 UR sobre la celda de flujo de referencia. Después de cada experimento, las superficies se regeneraron con HCl 30 mM, permitiendo la vuelta de las señales de resonancia a niveles basales. Los análisis se realizaron por duplicado.

45

Para los análisis cinéticos se utilizó una celda de flujo con cantidades pequeñas de NIP₁₀-BSA (aproximadamente 100 UR) con el fin de minimizar los efectos de transporte de masa y re-unión. Las muestras individuales, constituidas por scFv o trimerbodies purificados, se pasaron sobre la superficie del chip a una velocidad de flujo de 20 µl/minuto y se midieron las velocidades de asociación/disociación. Los cambios en el índice de refracción se eliminaron mediante la sustracción de las respuestas de los chips de referencia y la respuesta media de un control negativo se restó a todos los sensogramas. Los resultados cinéticos se obtuvieron utilizando el software BIAevaluation v4.1, proporcionado con el biosensor, y los datos cinéticos se ajustaron a un modelo de interacción de Langmuir 1:1.

50

Modelado comparativo de proteínas

La estructura del dominio de unión del anticuerpo L36 en formato scFv (scFv L36) fue modelada mediante modelado comparativo utilizando como molde la estructura 2GHW.B obtenida del Protein Data Bank (PDB) [Berman, H. M. *et al.* 2000; Nucleic Acids Res. 28:235-42]. La estructura del subdominio de trimerización NC1 del extremo amino terminal del colágeno XVIII murino fue obtenido a partir de ModBase [Pieper, U. *et al.* 2004, Nucleic Acids Res.; 32:D217-22]. Ambos dominios se encuentran unidos por un espaciador de 21 aminoácidos para formar un monómero del anticuerpo L36 en formato trimerbody. Las coordenadas de los monómeros restantes se obtuvieron mediante la aplicación de un eje triple de simetría de rotación. El modelo del trimerbody L36 se formó mediante la suma de las coordenadas de los tres monómeros. La estructura fue optimizada con GRÖMACS [Van Der Spoel, D. *et al.* 2005; J. Comput. Chem.; 26:1701-18] y su energía evaluada con DFIRE [Zhou, H. *et al.* 2002; Prot. Sci., 11: 2714-26]. Con el objetivo de comparar los valores de DFIRE entre el monómero y el trímero, las energías fueron normalizadas dividiéndolas por la longitud de la secuencia.

65

Ensayos de estabilidad en presencia de suero

Para determinar si el trimerbody mantenía su capacidad funcional en suero, 500 ng de trimerbody L36 purificado se incubaron a 37°C, durante 72 horas, con 12,5% de suero murino de ratones BALB/c (Harían Ibérica, Barcelona,

España). Se retiraron muestras para su análisis a las 3 h, 24 h y 72 h contadas desde el comienzo de la incubación y se congelaron hasta que se completó la totalidad del estudio. Como control, se congeló inmediatamente un segundo conjunto de muestras expuestas al suero para representar el tiempo “cero”. A continuación, se analizó la capacidad de los trimerbodies de retener su unión funcional a laminina murina por ELISA.

5

Conjugación de anticuerpos recombinantes con cianina 5

scFv L36 y los trimerbodies purificados se marcaron con el fluorocromo Cianina 5 (Cy5) NHS ésteres siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). La reacción de marcaje se realizó a temperatura ambiente durante 10 30 minutos, añadiendo 200 μ l de una solución de Cy5 (2 mg/ml) en dimetilsulfóxido (DMSO). Las moléculas de Cy5 no unidas se eliminaron mediante cromatografía de exclusión en Sephadex G25-M (columnas PD-10, GE Healthcare) y se concentraron en un filtro 10.000 MWCO Vivaspin 500 (Vivascience) a aproximadamente 1 mg/ml. La relación (molar) de Cy5 a anticuerpo (Cy5: anticuerpo), calculada según el procedimiento descrito por Birchler y col. (Birchler, M. *et al.* 1999; J. Immunol. Methods; 231:239-48), era próxima a 1:1. La funcionalidad de los Acs conjugados con 15 Cy5 fue verificada mediante ELISA frente a los antígenos específicos.

Ensayos de localización de tumores en ratones portadores con anticuerpos recombinantes mediante imagen molecular - Inmunofotodetección infrarroja en ratones portadores de tumores

20 Se implantaron subcutáneamente (s.c.) células MKN45, HT1080 o HeLa ($1-2 \times 10^6$) en la región dorsal de ratones hembra atímicos desnudos nu/nu de 6 semanas Hsd (ratones atímicos Nude-FoxItm - Harlan Ibérica). Las dimensiones de los nódulos se utilizaron para calcular el volumen tumoral utilizando la fórmula: (anchura)² x (longitud) x 0,52. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño apropiado (0,2-0,4 cm³), se administraron por vía intravenosa (i.v.), en la vena de la cola, 100 μ l de una solución de anticuerpo recombinante purificado en formato trimerbody marcado 25 con Cy5 en PBS (5 mg/kg). Las imágenes de fluorescencia *in vivo* se tomaron a diversos tiempos (3, 24 y 48 horas) después de la administración i.v. del anticuerpo marcado, con un sistema Hamamatsu dotado de una cámara digital de alta resolución con dispositivos de cargas acopladas (CCD) ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics). Para el análisis y procesamiento de las imágenes se empleó el software Wasabi (Hamamatsu Photonics). Los protocolos utilizados para la manipulación de animales que a continuación se detallan, han sido aprobados por el por el Comité de Ética Animal 30 del Hospital Universitario Puerta de Hierro.

II. Resultados

Diseño y expresión de las construcciones triméricas

35

Los análisis estructurales del dominio NC1 del colágeno XVIII murino sugieren que consiste en tres segmentos: un dominio de trimerización amino terminal implicado en el autoensamblaje de los homotrimeros; una región flexible sensible a proteasas; y un dominio compacto carboxiterminal de endostatina (ES) [Sasaki, T. *et al.* 1998; EMBO J. 17:4249-56]. Los investigadores han demostrado previamente que un Ac recombinante conteniendo el scFv L36 anti-laminina fusionado al dominio amino terminal NC1 del colágeno XVIII murino era producido y secretado en forma funcionalmente activa por células HEK-293 [Sánchez-Arévalo, LV *et al.* (2006). Int. J. Cancer 119:455-462]. Además, para proporcionar la suficiente flexibilidad espacial al scFv situado en la región amino terminal, se insertó un conector artificial de 21 aminoácidos [Sánchez-Arévalo, LV *et al.* (2006), citado *supra*].

45 La naturaleza trimérica de la proteína de fusión scFv-NC1 fue demostrada por ultracentrifugación [Sánchez-Arévalo, LV *et al.* (2006), citado *supra*] y cromatografía analítica de filtración en gel (Figura 1A). La elución del scFv L36 mediante cromatografía analítica de filtración en gel pone de manifiesto que es un monómero. La calibración de la columna según los marcadores utilizados proporciona un peso molecular de 24,2 kDa, acorde con el teórico (26,9 kDa). Por el contrario, la elución de la fusión scFv L36-NC1 se corresponde con un peso molecular de 109,3 kDa, 50 indicando su naturaleza trimérica (el peso teórico del trímero es de 111,4 kDa), acorde con los datos anteriores de ultracentrifugación [Sánchez-Arévalo, LV *et al.* (2006), citado *supra*]. Este formato de anticuerpo trimérico ha sido designado como “trimerbody”.

55 En la presente invención, se ha ampliado el concepto mediante el diseño de trimerbodies con especificidades diferentes para el hapteno NIP o el CEA humano. Los genes codificantes de los scFvs derivados de los Acs anti-NIP (B1.8) y anti-CEA humano (MFE23) se ensamblaron de forma similar y se expresaron como proteínas solubles en células HEK-293 en forma funcionalmente activa. Las proteínas recombinantes fueron purificadas mediante columnas de afinidad (IMAC) y el rendimiento de las mismas fue superior al 95%, según se verificó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Tanto los trimerbodies B1.8 como MFE-23 eluyeron de la columna con picos únicos (datos no mostrados) 60 comparables a los mostrados en la Figura 1A.

Estudios de unión a su antígeno

65 La funcionalidad de los trimerbodies purificados se demostró mediante ELISA frente a los antígenos inmovilizados conjugados NIP-BSA (NIP₁₀-BSA), laminina EHS murina y CEA humano (Figura 1B). Su capacidad para detectar a su antígeno en un contexto celular fue investigada mediante el marcaje por inmunofluorescencia de células tumorales humanas que expresan el antígeno CEA en su superficie celular. La fluorescencia se observó tras la incubación con el trimerbody MFE-23, seguido de reacción con el AcM anti-myc y detección con el Ac de cabra anti-IgG de ratón

conjugado con FITC. Por el contrario, la incubación de células que expresan CEA (CEA⁺) con el trimerbody B1.8 o la incubación con células HeLa que no expresan CEA (CEA⁻) con el trimerbody MFE-23 no mostró fluorescencia alguna (Figura 1C). Estos resultados indican que los trimerbodies no sólo reconocen al antígeno inmovilizado, sino que también reconocen el antígeno nativo expresado en la superficie de células tumorales.

5 Los ensayos de SPR sirvieron para determinar la influencia del formato de scFv o de trimerbody sobre la funcionalidad del Ac B1.8. Se compararon las cinéticas de unión de cada formato de Ac utilizando tres densidades diferentes del NIP₁₀-BSA inmovilizado sobre la superficie del chip. Se utilizó BSA acoplado a dextrano como referencia de inespecificidad. Para comparar las respuestas de unión durante los procesos de asociación-disociación, se inyectaron
10 varias concentraciones de Ac B1.8 (desde 9 a 1.200 nM para el scFv y de 6 a 800 nM para el trimerbody). Bajo estas condiciones, solo el trimerbody alcanzó la saturación de la superficie del antígeno, mientras que el scFv se unió lentamente y con una disociación aparente más rápida. Los sensoogramas indican que el trimerbody tiene una mayor capacidad de unión que su versión monovalente (Figura 1D).

15 Para los estudios cinéticos, se utilizó un chip recubierto con aproximadamente 100 UR de NIP₁₀-BSA. En estos ensayos, el scFv B1.8 se comportó de forma muy diferente al trimerbody B1.8, con cocientes de asociación más lentos y de disociación más rápidos. Las constantes cinéticas de asociación (k_a) y de disociación (k_d) se determinaron mediante ajuste simultáneo utilizando el modelo de interacción Langmuir 1:1. Para el scFv B1.8, las constantes cinéticas de asociación (k_a) y de disociación (k_d) aparentes fueron k_a : $1,0 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y k_d : $2 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-5}$
20 s^{-1} ($\text{Chi}^2 = 0,189$). Utilizando $K_D = k_d/k_a$, la constante de disociación en equilibrio para scFv B1.8, se estimó en $2 \times 10^{-7} \text{ M}$. Dependiendo de la concentración de Ac utilizado en cada ensayo, el trimerbody inyectado en condiciones de baja densidad de NIP₁₀-BSA inmovilizado podría probablemente unirse de forma mono- y multivalente, e incluso las constantes cinéticas de unión aparentes podrían incluir efectos de avidéz por unión multivalente. Usando un modelo de interacción 1:1 en el que las fases de asociación y disociación se tratan de forma separada para cada concentración,
25 se ajustaron los resultados experimentales para la unión de B1.8 trivalente. Los datos de las curvas con valores de resonancia que se aproximan a R_{max} serían próximos a los obtenidos para la unión monovalente. En este caso, a medida que la concentración del trimerbody B1.8 aumentaba, la k_a disminuyó de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (12,5 nM trimerbody) a $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (800 nM trimerbody). Estos cambios son compatibles con los cambios en la proporción de anticuerpo que se une al ligando de forma mono- o multivalente, ya que una aproximación a la saturación de la superficie conduce a
30 una proporción mayor de unión de anticuerpo monovalente. La k_a aparente tiene un rango más estrecho, de 6×10^{-4} (12,5 nM) a 9×10^{-4} (800 nM). Considerando que a 12,5 nM, la mayor parte de los trimerbodies puede unirse de forma bi- o multivalente, la afinidad funcional del trimerbody calculada para esa concentración podría ser K_D (k_d/k_a) de $1,5 \times 10^{-9} \text{ M}$ o superior.

35 Para asegurar que al menos hay dos sitios activos de unión en una misma molécula de trimerbody, células 293T fueron transfectadas con los plásmidos codificantes de trimerbodies L36, B1.8 o con ambos plásmidos en una co-transfección. Ensayos de transferencia Western pusieron de manifiesto que ambos trimerbodies eran expresados en el sobrenadante de las células y que se unían a sus antígenos respectivos, y que la cantidad de trimerbody era más alta en células 293T co-transfectadas (con ambos plásmidos) que en células 293T monotransfectadas (datos no mostrados).
40 El medio condicionado de las células 293T monotransfectadas unidas a NIP₁₀-BSA o laminina, así como el medio condicionado de las células 293T co-transfectadas reconocen ambos antígenos (Figura 2A). En un ensayo de ELISA, medio condicionado de las células 293T co-transfectadas (es decir, doblemente transfectadas), se añadió a placas recubiertas con laminina y, tras lavado, los trimerbodies unidos a laminina eran capaces de capturar NIP₁₀-BSA soluble (Figura 2B), demostrando su multivalencia. Por el contrario, los trimerbodies en el sobrenadante de células 293T monotransfectadas con el plásmido que codifica el trimerbody L36 eran incapaces de unirse y capturar NIP₁₀-BSA soluble.
45

Ensayos de estabilidad frente a suero in vitro

50 Un aspecto muy importante para determinar la potencial aplicación *in vivo* de los fragmentos de Ac diseñados es comprobar la estabilidad frente a suero. Los investigadores han determinado la funcionalidad y la estabilidad estructural del trimerbody L36 tras incubación con suero humano y murino a 37°C durante periodos prolongados de tiempo (igual o superiores a 72 horas), mediante ensayos de transferencia Western y ELISA. Tal como se muestra en la Figura 3, el trimerbody L36 mantiene un 80-90% de su capacidad de unión a su antígeno tras 72 horas de incubación.
55

Ensayos de localización específica de tumores in vivo

60 Para evaluar la biodistribución de, y la localización específica de tumores por, los trimerbodies anti-NIP, anti-CEA y anti-laminina, se utilizó un sistema óptico de imagen molecular, que permite la evaluación de la cinética de localización del tumor y del aclaramiento por el Ac en un mismo animal y en diferentes tiempos del ensayo. Los trimerbodies fueron conjugados con el fluorocromo de emisión cercana al infrarrojo Cy5 e inyectados por vía intravenosa (i.v.) en la vena de la cola de ratones hembra atímicos desnudos nu/nu portadores de tumores humanos MKN45 (adenocarcinoma gástrico), HT-1080 (fibrosarcoma), o HeLa (adenocarcinoma de cérvix) (n =4/grupo). Todos los trimerbodies mostraron un rápido aclaramiento renal tras la inyección i.v., con un máximo de intensidad de seftal
65 a las 3 horas, siendo indetectable a las 48 horas post-inyección (Figuras 4A y 4C).

El trimerbody B1.8 no mostró localización detectable de tumor en ninguno de los tres tipos de tumores estudiados (Figuras 4B y 5). Se observó una selectiva y fuerte acumulación en los tumores que expresan CEA (CEA⁺) del trimer-

body MFE-23. Tras la inyección i.v. del trimerbody MFE-23-Cy5, el máximo de señal registrada se produjo a las 3 horas, decayendo la señal a las 24 horas y manteniéndose detectable a las 48 horas (Figura 4B). El trimerbody anti-laminina mostró localización específica de tumor en todos los modelos estudiados (sean o no tumores que expresasen CEA) (Figuras 4B y 5). Sin embargo, la cinética de intensidad de señal resultó diferente al trimerbody MFE-23, siendo el máximo de señal a las 24 horas, algo menor que el máximo obtenido por el trimerbody MFE-23. El scFv anti-laminina también mostró localización específica de tumor pero a un nivel mucho más bajo que el del trimerbody anti-laminina (Figuras 4B y 4D).

III. *Discusión*

Estudios previos de los investigadores mostraban la capacidad de las secuencias derivadas de colágeno de promover la trimerización de anticuerpos [Sánchez-Arevalo VJ *et al* (2006) *Int J Cancer* 119:455-462]. En dichos estudios, se mostraba que la fusión del subdominio NC1 N-terminal de colágeno XVIII, responsable de la trimerización no-covalente de las cadenas alfa del colágeno XVIII al extremo C-terminal de un anticuerpo scFv, confiere un estado trimérico al anticuerpo generado (“trimerbody”). Así, se demostró que utilizando un scFv (L36) que reconoce un epítipo de laminina asociado a angiogénesis y que inhibe la angiogénesis y el crecimiento del tumor, el L36 trimérico era más efectivo que el correspondiente monomérico en la inhibición de la morfogénesis capilar *in vitro*, e inhibiendo el crecimiento del tumor *in vivo* [Sánchez-Arevalo VJ *et al.* (2006), citado *supra*]. Otro grupo investigador [Fan CY *et al.* (2008). *FASEB J* 22:3795-3804] ha utilizado una aproximación similar para multimerizar anticuerpos y ha demostrado que un esqueleto de péptidos cortos similares a colágeno era capaz de promover la trimerización de fragmentos scFv fusionados (“collabody”).

En la presente invención, se presenta una caracterización detallada, tanto *in vivo* como *in vitro* de la fusión del anticuerpo-dominio de oligomerización, y se extiende el concepto produciendo moléculas análogas con especificidad frente al hapteno NIP y frente a un antígeno asociado a tumores (CEA). En particular, se han desarrollado unas proteínas triméricas (trímeros) que comprenden 3 proteínas de fusión, comprendiendo cada proteína de fusión un fragmento de un anticuerpo y una secuencia derivada de colágeno que comprende el dominio de trimerización; dichas proteínas oligoméricas (trímeros) caen dentro del concepto “trimerbody” acuñado en esta descripción.

Todos los trimerbodies se aislaron en una forma activa a partir de medio condicionado obtenido de células HEK293 transfectadas y fueron fácilmente purificados utilizando cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Los trimerbodies son triméricos en solución, y poseen una excelente estabilidad y capacidad de unión al antígeno. Los trimerbodies son muy eficientes reconociendo antígenos purificados inmovilizados sobre una placa, o expresados en la superficie de una célula tumoral. Análisis mediante SPR demostró que el trimerbody tenía una señal de unión mayor que el anticuerpo monomérico y aparentemente una disociación menor, consistente con la unión multivalente al antígeno. Los investigadores calcularon que el trimerbody anti-NIP tiene una afinidad funcional por el antígeno (conjugados NIP-BSA) unas 100 veces mayor, comparado con la versión monovalente. Este resultado sugiere que esta ganancia de afinidad podría ser debida al efecto de avidéz de un segundo sitio de combinación en la molécula de trimerbody. La presencia de al menos dos sitios de unión funcionales en una sola molécula de trimerbody fue posteriormente demostrada mediante la generación de trimerbodies biespecíficos. Trimerbodies bifuncionales anti-laminina y anti-NIP estables fueron fácilmente producidos por co-expresión de dos construcciones diferentes de trimerbodies en células humanas.

La ganancia en afinidad a través de la avidéz hace a los trimerbodies atractivos para técnicas de imagen *in vivo* como agentes alternativos a los anticuerpos diméricos. Se podría, por tanto, especular que los trimerbodies se preferirán sobre los anticuerpos diméricos (diabodies y minibodies), aunque esta propiedad puede depender de la estructura y densidad del antígeno reconocido por los scFv. Para una completa avidéz en anticuerpos multivalentes dirigidos a moléculas unidas a la superficie, los sitios de unión del antígeno deben apuntar hacia la misma dirección. Si la unión múltiple simultánea no es posible estéricamente, entonces la ganancia aparente en afinidad funcional es probable que sea menor y debida únicamente al efecto de unión aumentado, que es dependiente en tasas de difusión y la concentración del antígeno de superficie [Lawrence LJ *et al.* (1998) *FEBS letters* 425:479-484]. El análisis del modelo de trimerbody sugiere una estructura con forma de trípode con los dominios scFv orientados hacia fuera (Figura 6). La flexibilidad entre los sitios de unión al antígeno es otro aspecto importante en el diseño de anticuerpos multivalentes, requeridos para el entrecruzamiento de receptores de superficie, bien en la misma célula o en adyacentes. El espaciador de 21 residuos, con una longitud máxima de 79,8 Å si la conformación es completamente extendida, es muy flexible, permitiendo numerosas geometrías de unión. Cuando una interacción antígeno-anticuerpo ocurre, la posibilidad de establecer una segunda interacción depende de la valencia, orientación y flexibilidad del sitio de unión del antígeno. Según los cálculos de los inventores, en la molécula de trimerbody, los scFv que permanecen sin interaccionar tienen un área de influencia unas 11 veces mayor, aproximadamente, que otros formatos bivalentes, tales como los diabodies y los minibodies, aumentando la probabilidad de una segunda interacción efectiva. Uniones múltiples pueden, efectivamente, reducir las “off rates” aumentando así el tiempo de retención del anticuerpo unido al antígeno diana. A este respecto, una ventaja mayor del trimerbody sobre otros formatos triméricos (como el collabody) es la flexibilidad. La estructura más compacta/rígida del collabody reduce la accesibilidad de los scFv, que es un parámetro crítico para la localización de tumores *in vivo*.

Así, la multimerización de las construcciones scFv presenta ventajas para las aplicaciones *in vivo*. Los anticuerpos recombinantes, tal como los diabodies y minibodies han demostrado su potencial como agentes de localización *in vivo* [Holliger P *et al.* (2005) *Nat Biotechnol* 23:1126-1136]. Los trimerbodies son moléculas multivalentes de tamaño

intermedio que presentan una alta estabilidad en condiciones fisiológicas. El potencial de los trimerbodies para la localización *in vivo* se estudió en modelos experimentales de cáncer humano en ratones desnudos. Los trimerbodies anti-CEA localizan rápida y específicamente en los tumores CEA-positivos. La máxima señal en el tumor se alcanzaba a las 3 horas tras la inyección y era lentamente eliminada a lo largo del tiempo. La fluorescencia era aún detectable en el tumor tras 48 horas tras la inyección con el trimerbody. Es de destacar que el anticuerpo trimerbody anti-laminina L36 se localiza en todos los tumores estudiados independientemente de su estirpe histológica. El máximo de absorción de los trimerbodies anti-laminina fue a las 24 horas tras la administración del mismo. A pesar de que los scFv L36 anti-laminina presentaban una acumulación específica en el tumor, la acumulación en el tumor era menor, probablemente debido a su eliminación más rápida de la sangre (con una vida media menor de 15 minutos) y por su naturaleza monovalente (que implica bajos tiempos de retención) [Adams GP *et al.* (1995). *Cancer Immunol. Immunother.* 40:299-306].

Según resultados previos, el epítipo reconocido por el anticuerpo L36 está localizado en la parte media del brazo largo de la laminina, en un área altamente flexible, que corresponde a un sitio susceptible de proteasas. Los inventores han postulado que este epítipo es únicamente accesible durante el ensamblaje de la membrana basal (MB) [Sanz L *et al.* (2003) *EMBO J.* 22:1508-1517], donde la laminina intacta durante el proceso de polimerización actúa como soporte para el reclutamiento de otros componentes de la MB [Sasaki T *et al.* (2004) *J. Cell. Biol.* 164:959-963]. La expresión restringida de este epítipo a situaciones asociadas con la remodelación de la MB, explicaría la captación más lenta de los trimerbodies L36 en comparación con los trimerbodies MFE23 que reconocen un antígeno expresado por la célula tumoral.

Más allá de sus aplicaciones diagnósticas, los trimerbodies ofrecen oportunidades terapéuticas prometedoras basadas en la liberación selectiva de moléculas bioactivas en los tejidos diana. Algunas de las aplicaciones inmediatas de los trimerbodies específicos de antígenos asociados a tumores (por ejemplo, el receptor 2 del factor de crecimiento epidemial humano, antígeno específico de próstata), o dirigidos al estroma tumoral (por ejemplo, proteína de activación de fibroblasto) incluyen el desarrollo de proteínas de fusión con inhibidores angiogénicos [Sánchez-Arevalo VJ *et al.* (2006) *Int J Cancer* 119:455-462], citoquinas, enzimas, o receptores truncados, y conjugación con radionucleidos [Sanz L *et al.* (2004) *Trends Immunol* 25:85-91].

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína oligomérica que comprende una pluralidad de proteínas de fusión, iguales o diferentes, y un marcador (M), en la que cada proteína de fusión comprende:
- (a) un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo; y
 - 10 (b) un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización.
- 15 2. Proteína oligomérica según la reivindicación 1, en la que dicho marcador (M) es un fluoróforo o un radionucleido.
3. Proteína oligomérica según la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido (A) comprende un anticuerpo que reconoce una diana, o un fragmento funcionalmente equivalente de dicho anticuerpo que reconoce una diana, en donde dicha diana es un epítipo o determinante antigénico de un antígeno.
- 20 4. Proteína oligomérica según la reivindicación 3, en la que dicho antígeno es un antígeno que se expresa *de novo* o se sobreexpresa en una alteración patológica.
- 25 5. Proteína oligomérica según la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido (A) comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fab', un fragmento Fv de cadena única (scFv), un diabody o un anticuerpo monodominio (V_{HH}).
- 30 6. Proteína oligomérica según la reivindicación 1, en la que dicho dominio de oligomerización presente en dicho polipéptido (B) comprende el dominio NC1 de colágeno XVIII o del colágeno XV de mamífero, opcionalmente desprovisto total o parcialmente del dominio de endostatina (ES).
7. Proteína oligomérica según la reivindicación 1, constituida por 2 ó más proteínas de fusión, iguales o diferentes.
- 35 8. Un procedimiento para la obtención de una proteína oligomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende poner en contacto una proteína oligomérica que comprende una pluralidad de proteínas de fusión, iguales o diferentes, en la que cada proteína de fusión comprende:
- i) un polipéptido (A) que comprende un anticuerpo o un fragmento funcionalmente equivalente del mismo; y
 - 40 ii) un polipéptido (B) que comprende un dominio de oligomerización,
- con un marcador (M) bajo condiciones que permiten la unión de dicho marcador (M) a la proteína oligomérica.
- 45 9. Empleo de una proteína oligomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en un método para la detección, visualización o localización de una diana.
10. Empleo según la reivindicación 9, en el que dicha diana es un antígeno que se expresa *de novo* o se sobreexpresa en una alteración patológica.
- 50 11. Un método para la detección, visualización o localización de una diana que comprende el empleo de una proteína oligomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho método se basa en una técnica de imagen.
- 55 13. Método según la reivindicación 11, en el que dicha diana es un antígeno que se expresa *de novo* o se sobreexpresa en una alteración patológica.
- 60 14. Una composición que comprende una proteína oligomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, junto con, al menos, un medio apropiado.
15. Una composición farmacéutica que comprende una proteína oligomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, junto con, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 65 16. Un kit que comprende una proteína oligomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
17. Empleo de un kit según la reivindicación 16, para la detección, visualización o localización de una diana.

ES 2 371 426 A1

18. Empleo según la reivindicación 17, en el que dicha diana es un antígeno que se expresa *de novo* o se sobreexpresa en una alteración patológica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

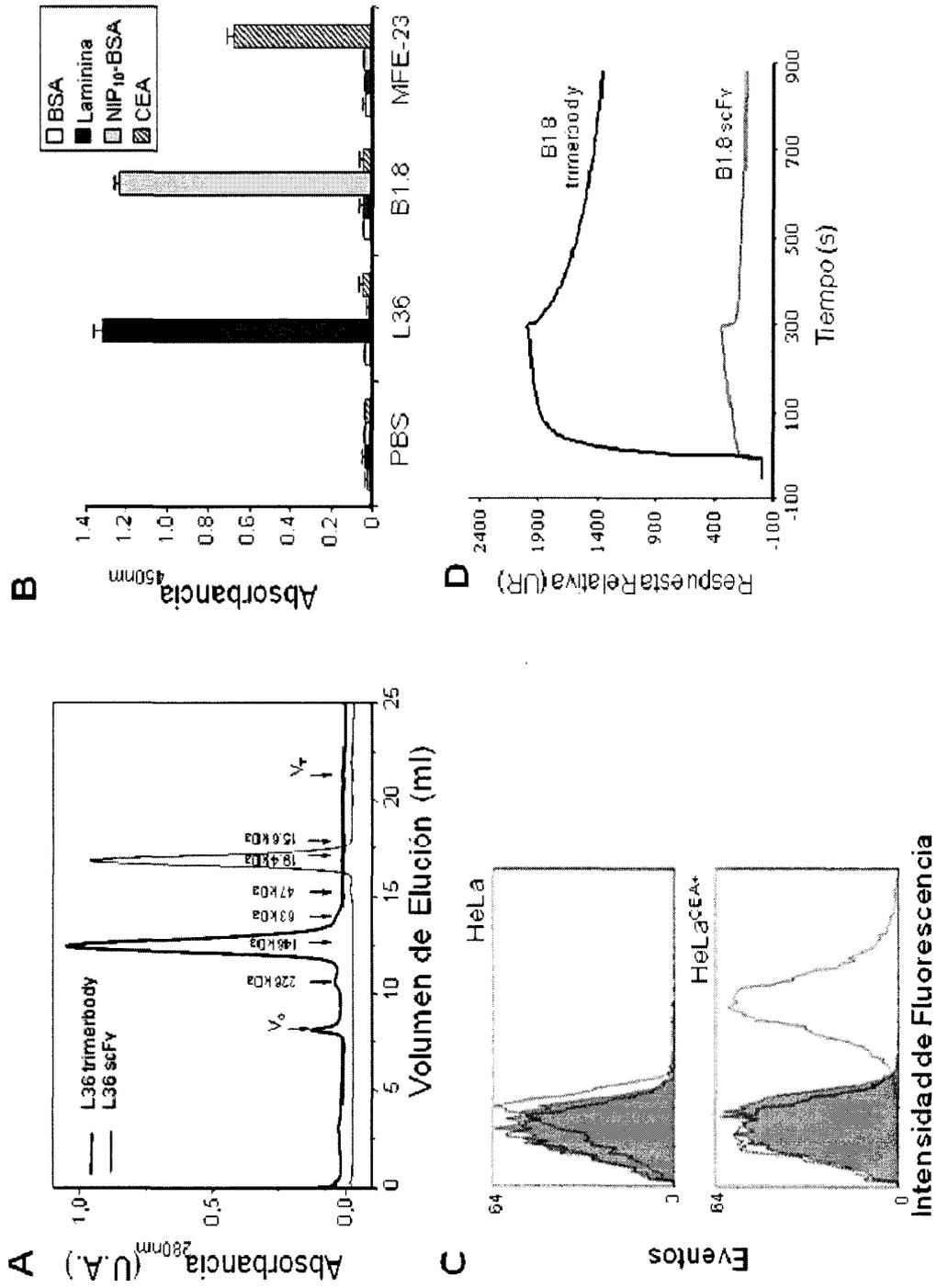


FIG. 1

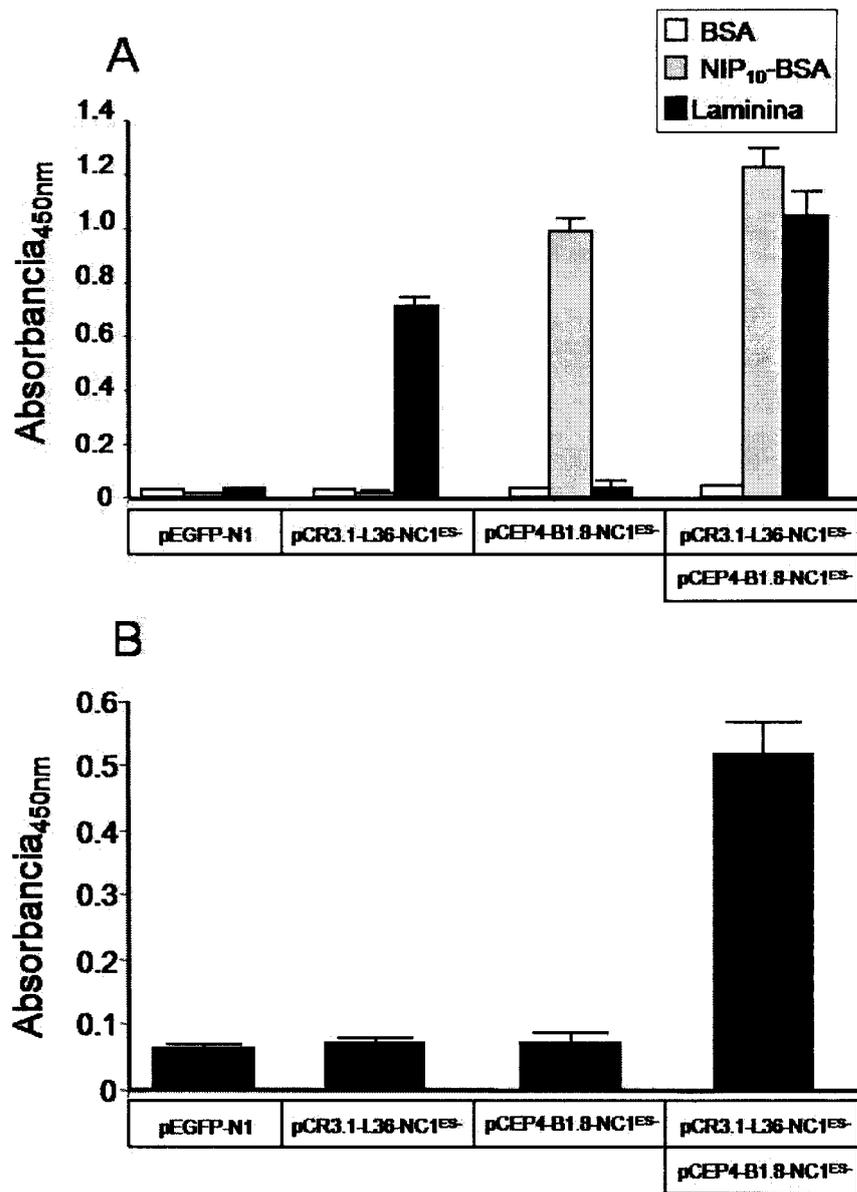


FIG. 2

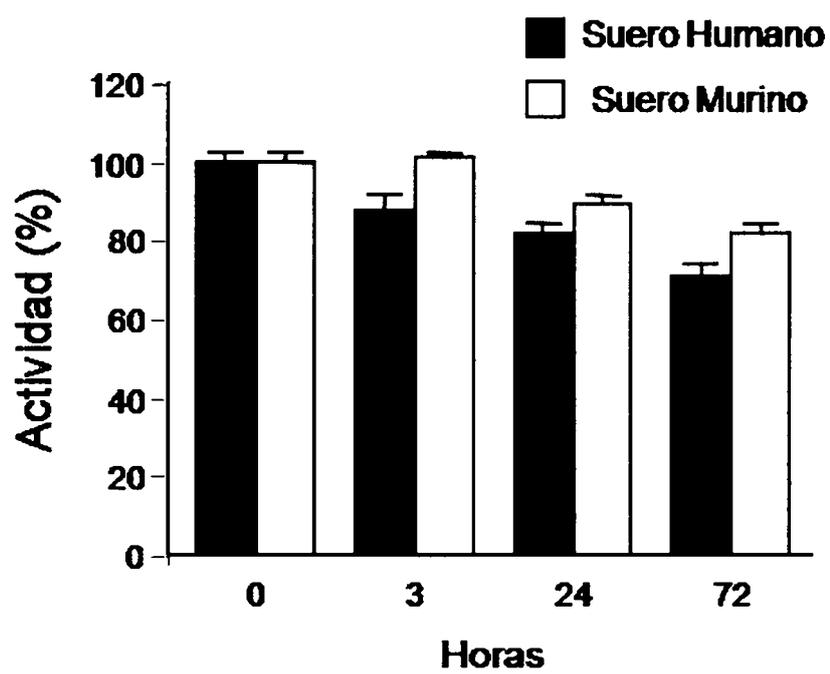


FIG. 3

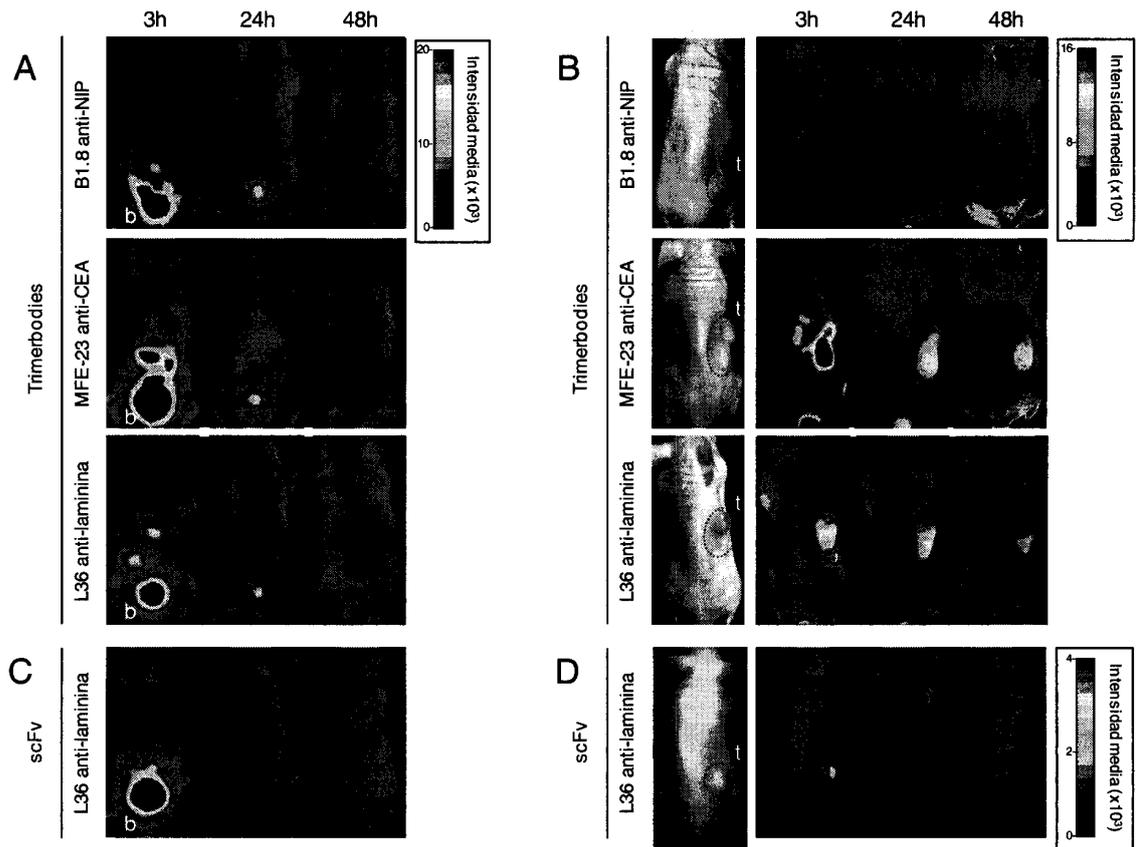


FIG. 4

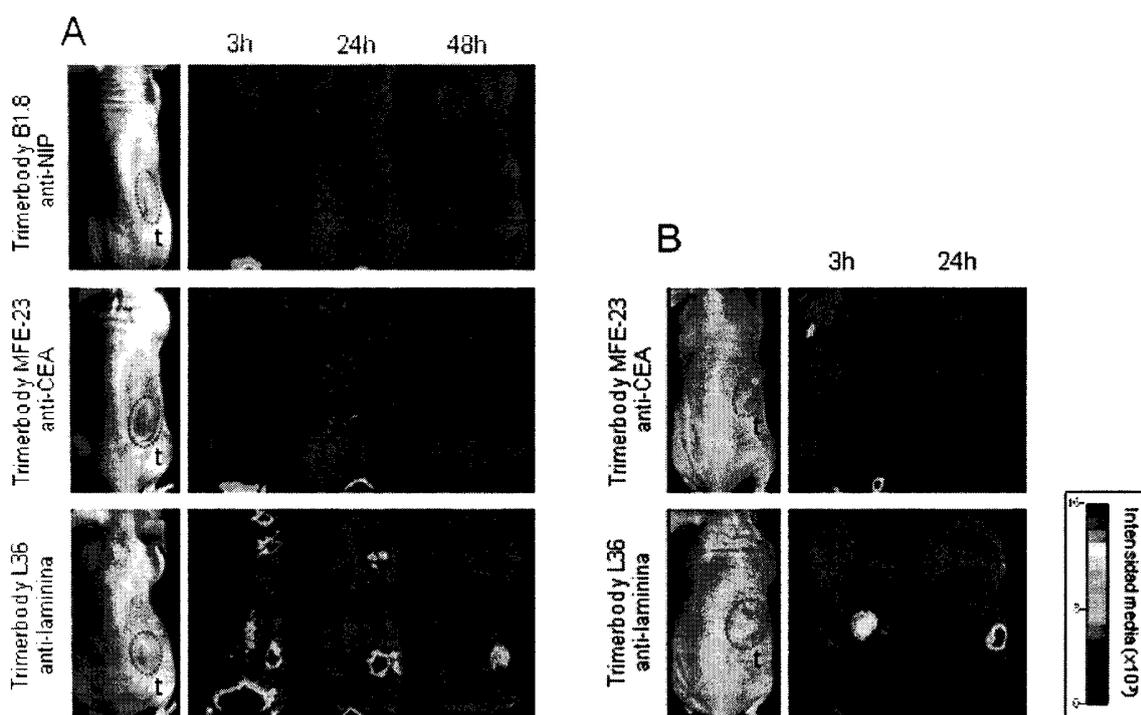


FIG. 5

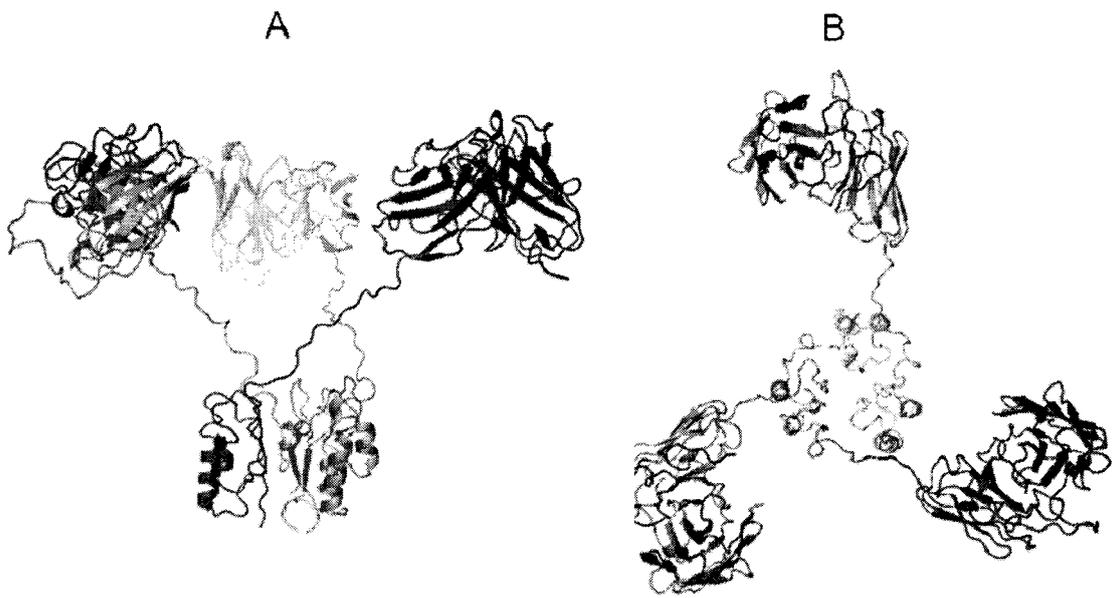


FIG. 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901027

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.04.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1798240 A1 (IND TECH RES INST.) 20.06.2007, Reivindicaciones 1, 4-8. Figuras 4A, 4B. Ejemplo 2.	1-5,7,9-18
X	Sánchez-Arévalo Lobo Víctor J. et al. "Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events". International journal of cancer. 15.07. 2006. Vol. 119. Nº. 2. Páginas 455 – 462. ISSN 0020-7136 (Print).	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.12.2011

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K16/28 (2006.01)

C07K16/30 (2006.01)

C07K19/00 (2006.01)

C07K14/435 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-18	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1798240 A1 (IND TECH RES INST.)	20.06.2007
D02	Sánchez-Arévalo Lobo Víctor J. et al. "Enhanced antiangiogenic therapy with antibody-collagen XVIII NC1 domain fusion proteins engineered to exploit matrix remodeling events". International journal of cancer. 15.07. 2006. Vol. 119. Nº. 2. Páginas 455 – 462. ISSN 0020-7136 (Print).	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una proteína oligomérica formada por la combinación de varias proteínas de fusión y su empleo en la detección o visualización de moléculas diana.

Las reivindicaciones 1-7 caracterizan el producto denominado proteína oligomérica, y la reivindicación 8 caracteriza el procedimiento de obtención de la misma. Las reivindicaciones 9-13 caracterizan el uso de la proteína oligomérica para la detección de una molécula diana. Las reivindicaciones 14-15 se refieren a una composición farmacéutica que contenga la proteína oligomérica. De manera similar, las reivindicaciones 16-18 se refieren a un kit que contenga la proteína oligomérica y sus usos.

D01 divulga (reivindicaciones 1, 4-8) un complejo proteico trimérico de unión de antígenos que comprende tres polipeptidos, donde cada polipeptido comprende: un dominio andamio en bucle de triple hélice, un dominio heterólogo fusionado, que puede ser un anticuerpo, y opcionalmente un segundo dominio. En el ejemplo 2, se describe la generación de tres polipeptidos de fusión: OKT3_scFv-Col, erb_scFv-Col, y erb_NSFD-scFv. En el caso de scFv-Col, la región de scFv-Col incluye el dominio NC1 del colágeno XXI. En los estudios de afinidad a antígeno, en donde el antígeno ligante es el factor de crecimiento epidérmico EGFR, llevados a cabo por ELISA, se empleó detección quimioluminiscente tras la unión del marcador adecuado.

D02 describe, en la figura 1, la estructura de la proteína de fusión L36 scFv-collagen XVIII NC1. En su descripción esquemática se muestra que dicha proteína de fusión está formada por un anticuerpo trimérico junto al dominio denominado NC1 del colágeno XVIII.

Así pues, los documentos del estado de la técnica divulgan proteínas de fusión que contienen todas las características técnicas de la proteína oligomérica reivindicada. Además, esas proteínas de fusión son utilizadas para la detección de antígenos y más particularmente en la terapia contra el cáncer. Por tanto, las reivindicaciones 1-18 carecerían de novedad y actividad inventiva, tal y como se menciona en los arts. 6 y 8 de la Ley 11/1986.