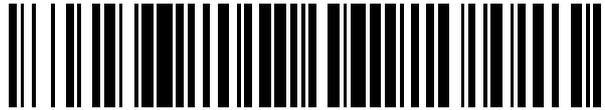


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 438**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2007 E 07801764 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2054432**

54 Título: **Proteínas de unión específicas y de alta afinidad que comprenden dominios SH3 modificados de la quinasa Fyn**

30 Prioridad:

21.08.2006 EP 06017336

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2015

73 Titular/es:

**EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE
ZÜRICH (100.0%)
ETH TRANSFER, RÄMISTRASSE 101
8092 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**GRABULOVSKI, DRAGAN y
NERI, DARIO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 548 438 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión específicas y de alta afinidad que comprenden dominios SH3 modificados de la quinasa Fyn

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una proteína de unión recombinante como se define por las reivindicaciones, dicha proteína de unión recombinante comprende al menos un derivado del dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN, en donde al menos un aminoácido en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle src y al menos un aminoácido en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle RT se sustituye, deleciona o añade. Además, la invención se dirige a proteínas de fusión que comprenden una proteína de unión como se define por las reivindicaciones, fusionada a un componente farmacéuticamente y/o diagnósticamente activo. Además, la invención se refiere a nucleótidos que codifican estas proteínas de unión y/o de fusión así como a los correspondientes vectores y células huéspedes. Por último pero no menos importante, la presente invención se refiere al uso de las proteínas de unión y/o de fusión como se definen por las reivindicaciones para preparar un medicamento o un medio diagnóstico así como a composiciones farmacéuticas o diagnósticas que comprenden dichas proteínas de unión y/o de fusión.

20 **Antecedentes de la invención**

Los agentes de unión específicos y de alta afinidad son herramientas indispensables para la investigación biológica y médica y también tienen utilidad para el diagnóstico médico, profilaxis y tratamiento. Actualmente, los anticuerpos monoclonales son la clase predominante de moléculas de unión que se pueden aislar rápidamente con alta afinidad y especificidad hacia virtualmente cualquier diana. Sin embargo, las inmunoglobulinas tienen limitaciones que se basan principalmente en sus propiedades biofísicas generales y su estructura molecular bastante complicada. Por tanto, ya en la década de 1990 varios grupos de investigación han explorado proteínas globulares pequeñas como sustitutos para los anticuerpos. La idea detrás de este concepto es la transferencia de un sitio de unión universal desde una estructura de anticuerpo a marcos proteicos alternativos, los denominados andamiajes. Hasta ahora se han descrito más de 40 andamiajes, entre ellos dos dominios SH3, los dominios SH3 de las quinasas Abl y Src (véase Binz et al., Nature Biotechnology, Vol. 23, No. 10, 1257-1268, 2005).

Los dominios SH3 se encuentran en muchas proteínas diferentes implicadas en la señalización intracelular y organización citoesquelética (Cohen et al., "Modular binding domains in signal transduction proteins". Cell 80(2): 237-48, 1995). A pesar de la variabilidad en sus estructuras primarias estos dominios SH3 comparten un estructura global muy similar y un modo de unión a proteínas que comparten la secuencia consenso mínima PxxP que es un determinante crítico para unión a SH3 natural. Una función importante de los dominios SH3 es participar en interacciones proteína-proteína muy selectivas.

El documento EP 1541694 A1 describe un método de identificar, seleccionar y/o caracterizar un compuesto que modula la actividad de al menos una quinasa de la familia Src. Se refiere además a compuestos identificados por dicho método, composiciones farmacéuticas y el uso de esos compuestos y composiciones farmacéuticas en el tratamiento de enfermedades, que están causadas al menos en parte por una quinasa de la familia Src.

El documento US 6.326.469 B1 se refiere a tirosinas quinasas citoplásmicas aisladas de megacariocitos (megacariocito quinasas o MKK) que están implicadas en rutas de transducción de señal celular y al uso de estas proteínas en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. La patente en EE UU se refiere además a megacariocito quinasas específicas, designadas MKK1, MKK2 y MKK3, y su uso como agentes terapéuticos y diagnósticos.

Erpel et al. ("Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions". Embo J. 14(5): 963-75, 1995) investigaron la influencia de mutaciones en los bucles RT y n-Src de dominios SH3 de Src y demostraron que mutaciones en ambos bucles que están adyacentes a la superficie hidrofóbica podían influir la capacidad de este dominio para participar en asociaciones inter- e intramoleculares.

Hiipakka et al. ("SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef". J. Mol. Biol. 293(5): 1097-106, 1999) investigaron la capacidad del bucle RT del dominio SH3 de Hck para actuar como un determinante de especificidad y afinidad versátil. Los autores construyeron una biblioteca en fagos de dominios de Hck, donde 6 aminoácidos del bucle RT se aleatorizaron (llamada RRT-SH3). Usando esta estrategia identificaron dominios RRT-SH3 individuales que se pueden unir a Nef de VIH-1 hasta 40 veces mejor que Hck-Sh3. Los autores indican la importancia del bucle RT en la selección de ligando de SH3 como una estrategia general para crear dominios SH3 con propiedades de unión deseadas.

Lee et al. ("A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein". Embo. J. 14(20): 5006-15, 1995) investigaron la base estructural de las diferentes afinidades y especificidades de unión de SH3 de Hck a la proteína Nef de VIH-1 y fueron capaces de transferir la propiedad de

unión de SH3 de Hck hacia Nef al dominio SH3 de Fyn mediante una única mutación en el bucle RT del dominio SH3 de Fyn (R96I).

5 Hosse et al. ("A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition", Protein Science, 15: 14-27, 2006) específicamente aborda los requisitos para proteínas de unión adecuadas para aplicaciones terapéuticas. Los autores indican la importancia de algunas características para proteínas de unión terapéuticamente útiles tal como estabilidad en suero, penetración de tejido, depuración en sangre, retención de diana y respuesta inmunitaria. En el último respecto se indica que las proteínas terapéuticas no humanas se deben hacer tan similares a sus equivalentes humanos como sea posible y un andamiaje humano podría ser menos inmunógeno desde el principio. Estos autores concluyen:

15 "Sin embargo, incluso un andamiaje enteramente humano no es garantía de que una proteína no provoque una respuesta inmunitaria humana, especialmente si es una proteína intracelular. La aleatorización de aminoácidos durante la construcción de la biblioteca puede potencialmente introducir epítomos de células T novedosos. Incluso mutaciones puntuales únicas pueden dar una proteína humana inmunógena. Además, la mayoría de los andamiajes humanos causan alguna respuesta autoinmunitaria".

20 Hoy, los dominios SH3 de las quinasas Abl y Hck se reconocen como andamiajes proteicos para generar unidores de proteína con especificidad prescrita, incluso aunque solo se han identificado unidores hacia ligandos conocidos como las proteínas Nef o péptidos sintéticos hasta ahora (Véase Binz et al., anteriormente).

25 El dominio SH3 de la quinasa Fyn (Fyn SH3) comprende 63 residuos (aa 83-145 de la secuencia descrita por Semba et al. ("yes-related protooncogene, syn, belongs to the protein-tyrosine kinase family". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(15): 5459-63, 1986) y Kawakami et al. ("Isolation and oncogenic potential of a novel human src-like gene". Mol Cell Biol. 6(12): 4195-201, 1986). Fyn es un miembro de 59 kDa de la familia Src de tirosinas quinasas. Como resultado de ajuste alternativo la proteína Fyn existe en dos isoformas diferentes que se diferencian en sus dominios quinasa; una forma se encuentra en timocitos, esplenocitos y algunas líneas celulares hematolinfoides, mientras que una segunda forma se acumula principalmente en cerebro (Cooke y Perlmutter, "Expression of a novel form of the Fyn proto-oncogene in hematopoietic cells". New Biol. 1(1): 66-74, 1989). Las funciones biológicas de Fyn son diversas e incluyen señalización a través del receptor de células T, regulación de la función cerebral así como señalización mediada por adhesión (Resh, M. D. "Fyn, a Src family tyrosine kinase". Int. J. Biochem. Cell Biol. 30(11): 1159-62, 1998). Es una proteína intracelular. SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de SH3 de Fyn (aa 83-145 de la quinasa Fyn como describieron Kawakami et al., y Semba et al., en 1986, véase anteriormente):

GVTLFVALYDYEARTEDDL~~S~~FKGKFKILNSSEGDWWEARSLTTGETGYIPSNY
VAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1)

35 La secuencia del bucle RT-Src y el n-Src están subrayada y doble subrayada, respectivamente.

40 La secuencia de aminoácidos de SH3 de Fyn está completamente conservada entre el hombre, ratón, rata y mono (gibón). El SH3 de Fyn de pollo se diferencia en una, el de *Xenopus laevis* en dos posiciones de aminoácidos del dominio humano correspondiente. Como otros dominios SH3 el SH3 de Fyn está compuesto de dos láminas β antiparalelas y contienen dos bucles flexibles (llamados bucles RT-Src y n-Src) para interaccionar con otras proteínas.

45 En resumen, el estado de la técnica enseña marcos de proteínas, los denominados andamiajes, como alternativas a estructuras de anticuerpos establecidas. El dominio de homología 3 de Src (SH3) es uno de estos aproximadamente 40 o más andamiajes. Entre los muchos diferentes dominios SH3 (aproximadamente 300 en el genoma humano y varios miles descritos hasta ahora en la naturaleza) el SH3 de Fyn es uno, que se ha usado una vez antes para elucidar la especificidad de unión de SH3 y afinidad en general. El experto en la materia también sabe que las proteínas intracelulares son particularmente propensas a producir respuestas inmunitarias y, por tanto, son típicamente menos útiles o incluso inútiles para aplicaciones *in vivo* como terapia y diagnóstico.

55 El objeto que subyace la presente invención es proporcionar proteínas de unión específicas y de alta afinidad diana mejoradas que sean adecuadas como agentes de investigación y en particular, como agentes diagnósticos y médicos. Además, estas proteínas de unión deben ser estables y solubles en condiciones fisiológicas, provocar poco o ningún efecto inmunitario en seres humanos que reciben estas, y proporcionar una estructura de unión que también sea accesible por estructuras diana grandes, es decir, que no esté enmascarada por impedimento estérico.

60 Descripción de la invención

Se encontró sorprendentemente que el dominio SH3 de la quinasa Fyn de la familia Src proporciona excelentes propiedades para diseñar dominios de unión recombinantes con especificidad y alta afinidad para dianas

seleccionadas. En particular, se encontró que la especificidad diana se puede diseñar mutando el bucle RT y/o el bucle src lo que produce mayor variabilidad y propiedades de unión mejoradas para muchas dianas.

5 Además, se encontró inesperadamente que no solo la proteína de unión de SH3 de Fyn nativa sino también proteínas de unión derivadas de SH3 de Fyn mutadas no eran inmunógenas *in vivo*. Por tanto, las proteínas de unión de SH3 de Fyn mutantes recombinantes son particularmente útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos y/o diagnósticos proteicos no inmunógenos.

10 La presente invención se define por las reivindicaciones. Según esto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una proteína de unión recombinante que tiene una afinidad de unión específica a una proteína o péptido, en donde dicha proteína o péptido no es un ligando de unión a SH3 natural, que comprende al menos un derivado del dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa Fyn, en donde

15 (a) al menos un aminoácido en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle src y
 (b) al menos un aminoácido en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle RT
 se sustituye, deletiona o añade, en donde el derivado del dominio SH3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70, preferiblemente al menos el 80, más preferiblemente al menos el 90 y lo más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en donde dicho derivado del dominio SH3 tiene al menos el 85% de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa el dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN fuera de los bucles src y RT
 20 y siempre que la proteína recombinante no sea una proteína que contiene un dominio SH3 natural existente en la naturaleza.

25 La proteína de unión recombinante de la invención no comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (la variante del SH3 de Fyn R96I de Lee et al., véase anteriormente) se proporciona a continuación.

**GVTLFVALYDYEAITEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDWWEARSLTTGETGYIPSNYV
 APVDSIQ (SEQ ID NO: 2)**

30 En el contexto de esta invención el bucle RT de la quinasa Fyn (algunas veces también designado bucle RT-Src) consiste en los aminoácidos E A R T E D que están localizados en las posiciones 12 a 17 en SEQ ID NO: 1. Las posiciones se van sustituir, deletionar y/o añadir, es decir, que se van mutar, en o adyacentes al bucle RT son los aminoácidos 10 a 19, preferiblemente 11 a 18, más preferiblemente 12 a 17.

35 En el contexto de esta invención el bucle src de la quinasa FYN (algunas veces también designado bucle n-Src) consiste en los aminoácidos N S S E que están localizados en las posiciones 31 a 34 en SEQ ID NO: 1. Las posiciones se van sustituir, deletionar y/o añadir, es decir, que se van mutar, en o adyacentes al bucle src son los aminoácidos 29 a 36, preferiblemente 30 a 35, más preferiblemente 31 a 34.

40 La proteína recombinante de la invención no es una proteína que contiene un dominio SH3 natural existente en o aislada de la naturaleza. En otras palabras, el ámbito de la invención excluye proteínas que contienen dominios SH3 de tipo salvaje. Hay abundantes proteínas que contienen dominios SH3 en la naturaleza. Estas proteínas con SH3 naturales tienen una afinidad de unión a sus ligandos naturales. La mayoría si no todos de estos ligandos de SH3 naturales tienen un motivo PxxP. Sin embargo, las proteínas recombinantes de la invención son proteínas manipuladas diseñadas para tener afinidades a dianas no naturales, es decir, dianas no naturales que es cualquier diana, por ejemplo, en la naturaleza, preferiblemente en un mamífero, más preferiblemente en un ser humano, excluyendo ligandos de SH3 naturales (de tipo salvaje). Las proteínas recombinantes de la invención esencialmente no tienen afinidad de unión a ningún ligando de unión a SH3 natural, lo más preferiblemente no a ningún ligando de unión a SH3 natural que tiene un motivo PxxP.
 45 50

Preferiblemente, el número de aminoácidos que se va a añadir en uno y/o ambos bucles es de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10 o de 1 a 5 aminoácidos, y lo más preferiblemente no se añaden aminoácidos en los bucles.
 55

En otra forma de realización preferida, las porciones del derivado del dominio SH3 que están fuera de los bucles RT y src están conservados tanto como sea posible para no introducir motivos inmunógenos.

60 Se prefiere que las proteínas recombinantes de la invención esencialmente no provoquen una reacción inmunógena en mamíferos, preferiblemente en ratón, rata y/o ser humano, lo más preferiblemente en ser humano. Por supuesto, al inmunogenicidad de la proteína recombinante completa de la invención no solo dependerá de la parte derivada del dominio SH3 sino que puede estar influida por otras partes de la proteína entera.

En una forma de realización preferida de la invención, al menos la parte derivada del dominio SH3 de la proteína recombinante es esencialmente no inmunógena en mamíferos, preferiblemente en ratón, rata y/o ser humano, lo más preferiblemente en ser humano.

5 Por ejemplo, el experto en la materia puede determinar reacciones inmunógenas de la proteína recombinante o su parte derivada del dominio SH3 por técnicas estándar y rutinarias, por ejemplo, administrando (por ejemplo, inyección i.v.) una proteína recombinante de interés o su derivado del dominio SH3 a un mamífero tal como un ratón y analizar la respuesta de las células sanguíneas y/o factores inmunógenos (por ejemplo, interleuquinas) después de un tiempo apropiado para que se produzca una reacción inmunitaria.

10 En una forma de realización más preferida la proteína de unión según la invención es una, en donde dicho derivado del dominio SH3 tiene al menos el 90, preferiblemente al menos el 95, lo más preferiblemente al menos del 98 al 100% de identidad al dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN fuera de los bucles src y RT.

15 En una forma de realización preferida las mutaciones se introducen en los bucles tanto RT como src.

En una forma de realización más preferida adicional la proteína de unión de la invención comprende uno o preferiblemente dos residuos alterados en las posiciones 37 y/o 50 del derivado del dominio SH3, preferiblemente dos residuos hidrofóbicos alterados, más preferiblemente Trp37 y/o Tyr50, siendo Trp37 y Tyr50 lo más preferido. Como se demuestra en la figura 3b posteriormente su aleatorización puede aumentar la afinidad.

20 El término "derivado del dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN", como se usa en el presente documento, se pretende que abarque una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70, preferiblemente al menos el 80, más preferiblemente al menos el 90, y lo más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El mismo significado es cierto para un derivado del dominio SH3 que tiene al menos el 85, preferiblemente al menos el 90, más preferiblemente al menos el 95, lo más preferiblemente al menos el 98% de identidad respecto al dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN fuera de los bucles src y RT, excepto que los aminoácidos que forman dichos bucles están excluidos cuando se determina la identidad de secuencia.

30 Con el fin de determinar el grado de identidad de secuencia de un derivado del dominio SH3 de FYN respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, se puede emplear el programa de similitud local SIM (Xiaoquin Huang y Webb Miller, "A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm". Advances in Applied Mathematics, vol. 12: 337-357, 1991), libremente disponible de los autores y su instituto (véase también la world wide web: <http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>); para análisis de alineamiento múltiples se puede usar ClustalW (Thompson et al., "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", Nucleic Acids Res., 22(22): 4673-4680, 1994). Preferiblemente, el grado de la identidad de secuencia del derivado respecto a SEQ ID NO: 1 se determina relativo a la secuencia completa de SEQ ID NO: 1.

40 En una forma de realización preferida la proteína de unión de la invención comprende al menos dos derivados del dominio SH3 de Fyn. Más preferiblemente, es una proteína de unión bivalente. Los al menos dos derivados del dominio SH3 pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, son iguales.

45 La proteína de unión de la invención se puede diseñar para que tenga cualquier afinidad de unión específica a un péptido o proteína dados, tal como uno que comprende un motivo PxxP, siempre que dicha proteína o péptido no sea un ligando de unión a SH3 natural. Por supuesto, solo una minoría de proteínas diana naturales y fisiológicamente relevantes contiene un motivo PxxP. Los ejemplos posteriores demuestran que las proteínas de unión según la invención para dianas (por ejemplo, dominio ED-B de fibronectina) con motivos diferentes de PxxP están disponibles. Por tanto, la proteína de unión de la invención no está en modo alguno limitada al motivo PxxP y puede tener una afinidad de unión específica a cualquier péptido o proteína dados, en donde dicha proteína o péptido no es un ligando de unión a SH3 natural.

50 Más preferiblemente, la proteína de unión según la invención tiene una afinidad de unión específica a una diana de 10^{-7} a 10^{-12} M, preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} M, preferiblemente una diana terapéuticamente y/o diagnósticamente relevante, más preferiblemente una diana basada en aminoácidos que comprende un motivo PxxP.

55 En un aspecto más preferido, la proteína de unión según la invención tiene una afinidad de unión específica (*in vivo* y/o *in vitro*) de 10^{-7} a 10^{-12} M, preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} M, al dominio extracelular de fibronectina oncofetal (ED-B).

60 También se describe en el presente documento una proteína de unión recombinante, que comprende al menos un derivado del dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN, en donde

- 65 (a) al menos un aminoácidos en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle src y/o
(b) al menos un aminoácidos en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle RT,

se sustituye, deleciona o añade,

en donde el derivado del dominio SH3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70, preferiblemente al menos el 80, más preferiblemente al menos el 90, y lo más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

preferiblemente con la condición de que la proteína de unión recombinante no comprenda la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,

y preferiblemente con la condición de que la proteína recombinante no sea un proteína que contiene un dominio SH3 natural, existente en la naturaleza,

en donde dicha proteína de unión según la invención tiene una afinidad de unión específica (*in vivo* y/o *in vitro*) de 10^{-7} a 10^{-12} M, preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} M, al dominio extracelular de fibronectina oncofetal (ED-B).

Dicho derivado del dominio SH3 puede tener al menos el 85, preferiblemente al menos el 90, más preferiblemente al menos el 95, lo más preferiblemente al menos del 98 al 100% de identidad respecto al dominio de homología 3 de Src (SH3) fuera de los bucles src y RT.

La proteína de unión específica de ED-B anterior puede comprender al menos dos derivados del dominio SH3, preferiblemente es una proteína de unión bivalente.

Además, dicha proteína de unión específica de ED-B puede tener uno o más, preferiblemente dos, residuos alterados, preferiblemente hidrofóbicos, en las posiciones 37 y/o 50 del derivado del dominio SH3, en particular Trp37 y/o Tyr50, siendo Trp37 y Tyr50 lo más preferido.

Ya se han investigado un número de proteínas de fusión anticuerpo-citoquina para aplicaciones en, por ejemplo, terapia de artritis o cáncer, con frecuencia con resultados impresionantes. Por ejemplo, el anticuerpo humano L19 específico para el dominio ED-B de fibronectina (un marcador de angiogénesis) se ha usado para administrar citoquinas proinflamatorias (tal como IL-2, IL-12 o TNF) a tumores sólidos, algunas veces con beneficios terapéuticos impresionantes [para una revisión y referencias correspondientes véase Neri & Bicknell, *Nat. Rev. Cancer* (2005) 5: 436-446, y también el documento WO 01/62298].

La proteína de unión de la presente invención permite ahora sustituir anticuerpos en proteínas de fusión del estado de la técnica y también diseñar proteínas de fusión nuevas y menos inmunógenas para aplicaciones farmacéuticas y diagnóstica *in vivo* e *in vitro*.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de unión de la invención fusionada a una componente farmacéuticamente y/o diagnósticamente activo.

Una proteína de fusión de la invención puede comprender componentes no polipeptídicos, por ejemplo, enlazadores no peptídicos, ligandos no peptídicos, por ejemplo, para radionúclidos terapéuticamente o diagnósticamente relevantes.

Preferiblemente, dicho componente activo es una citoquina, preferiblemente una citoquina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN alfa, IFN beta, IFN gamma, IL-10, IL-15, IL-24, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, LIF, CD80, B70, TNF beta, LT-beta, ligando CD-40, ligando Fas, TGF-beta, IL-1alfa e IL-1 beta.

Más preferiblemente, dicho componente activo es un compuesto tóxico, preferiblemente un compuesto orgánico pequeño o un polipéptido, preferiblemente un compuesto tóxico seleccionado del grupo que consiste en caliqueamicina, neocarzinostatina, esperamicina, dinemicina, kedarcidina, maduropeptina, doxorubicina, daunorubicina, auristatina, cadena A de Ricina, modeccina, exotoxina A de *Pseudomonas truncada*, toxina de la difteria y gelonina recombinante.

En otra forma de realización preferida, la proteína de fusión según la invención es una, en donde dicho componente activo es una quimioquina, preferiblemente una quimioquina seleccionada del grupo que consiste en IL-8, GRO alfa, GRO beta, GRO gamma, ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2, PF4, Mig, IP-10, SDF-1alfa/beta, BUNZO/STRC33, I-TAC, BLC/BCA-1, MIP-1alfa, MIP-1 beta, MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1, HCC-4, DC-CK1, MIP-3 alfa, MIP-3 beta, MCP-1-5, Eotaxina, Eotaxina-2, I-309, MIPF-1, 6CKine, CTACK, MEC, Linfotactina y Fractalquina.

En una forma de realización preferida adicional la proteína de unión según la invención contiene aminoácidos artificiales.

En formas de realización preferidas adicionales de la proteína de fusión de la presente invención dicho componente activo es un colorante fluorescente, preferiblemente un componente seleccionado de los grupos de colorantes Alexa Fluor o Cy (Berlier et al., "Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates", *J Histochem Cytochem*. 51 (12): 1699-1712, 2003); un fotosensibilizador, preferiblemente bis(trietanolamino)Sn(IV) cloro e_6 ($SnChe_6$); un factor procoagulante, preferiblemente factor tisular; una enzima para la activación de un profármaco, preferiblemente una enzima seleccionada del grupo que consiste

en carboxipeptidasas, glucuronidasas y glucosidasas; un radionúclido bien del grupo de isotopos emisores de gamma, preferiblemente ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , o del grupo de emisores de positrones, preferiblemente ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I , o del grupo de emisores beta, preferiblemente ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{67}Cu , o del grupo de emisores alfa, preferiblemente ^{213}Bi , ^{211}At ; y/o un dominio Fc funcional, preferiblemente un dominio Fc funcional humano.

5 El dominio Fc funcional anteriormente mencionado permitirá dirigir una respuesta inmunitaria de mamífero a un sitio de unión diana específico del componente de la proteína de unión de la proteína de fusión, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas, profilácticas y/o diagnósticas.

10 Una forma de realización preferida adicional se refiere a proteínas de fusión según la invención como se ha mencionado anteriormente, que comprenden además un componente que modula la semivida en suero, preferiblemente un componente seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), inmunoglobulina y péptidos de unión a albúmina.

15 En una forma de realización más preferida, la proteína de fusión de la invención como se ha mencionado anteriormente comprende una proteína de unión de la invención que tiene una afinidad de unión específica (*in vivo* y/o *in vitro*) de 10^{-7} a 10^{-12} M, preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} M, al dominio extra de fibronectina oncofetal (ED-B). Preferiblemente, dicha proteína de unión específica de ED-B tiene uno o más, preferiblemente dos, residuos hidrofóbicos, en las posiciones 37 y/o 50 del derivado del dominio SH3, en particular Trp37 y/o Tyr50, siendo Trp37 y
20 Tyr50 lo más preferido.

Las proteínas de unión y fusión según la invención se pueden preparar por cualquiera de las muchas técnicas convencionales y bien conocidas tal como estrategias sintéticas orgánicas sencillas, técnicas de síntesis asistida en fase sólida o por sintetizadores automatizados comercialmente disponibles. Por otra parte, también se pueden
25 preparar por técnicas recombinantes convencionales solas o en combinación con técnicas sintéticas convencionales.

Aspectos adicionales de la presente invención se dirigen a (i) un polinucleótido que codifica una proteína de unión o una proteína de fusión según la invención, (ii) un vector que comprende dicho polinucleótido, (iii) una célula huésped que comprende dicho polinucleótido y/o dicho vector.

30 Los polinucleótidos pueden ser ADN, ARN, APN y cualquier otro análogo de los mismos. Los vectores y las células huésped pueden ser cualquier tipo convencional que se ajuste al fin, por ejemplo, producción de proteínas de unión y de fusión de la invención, vectores y células huésped terapéuticamente útiles, por ejemplo, para terapia génica. El experto en la materia será capaz de seleccionar esos polinucleótidos, vectores y células huésped de un abundante estado de la técnica y conformar su idoneidad particular para el fin deseado por métodos rutinarios y sin carga
35 excesiva.

Las proteínas de unión y de fusión de la presente invención no provocan una respuesta inmunitaria fuerte y preferiblemente no tienen esencialmente ninguna en mamíferos, en particular en seres humanos y ratones, como se demostró para ratones y se espera que análogamente sea cierto para seres humanos, también, porque el SH3 de Fyn es idéntico en ambas especies de mamíferos. Se encontró sorprendentemente que ni el SH3 de Fyn nativo ni el SH3 de Fyn mutado causa una respuesta inmunitaria en ratones inyectados i.v. con cualquiera. Esto fue inesperado porque la quinasa Fyn es una proteína intracelular y no participa en la selección de células B neonatales. Por tanto, las proteínas de unión y de fusión derivadas del SH3 de Fyn con especificidad y afinidad diana diseñadas son
45 particularmente adecuadas para aplicaciones terapéuticas, profilácticas y/o diagnósticas *in vivo*.

Por tanto, un aspecto muy relevante de la presente invención se refiere al uso de una proteína de unión o de fusión según la invención para preparar un medicamento.

50 En un aspecto adicional, la proteína de unión o de fusión de la invención se usa para preparar un medio diagnóstico, en particular para aplicaciones *in vivo*.

Preferiblemente, una proteína de unión o de fusión específica de ED-B como se ha descrito anteriormente se usa para preparar un medicamento o medio diagnóstico para el tratamiento o diagnóstico del cáncer.

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión o fusión de la invención y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición diagnóstica, preferiblemente para aplicaciones *in vivo*, que comprende una proteína de unión o fusión de la invención y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Preferiblemente, la composición farmacéutica o diagnóstica comprende una proteína de unión o de fusión específica de ED-B de la invención y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

65

Las composiciones farmacéuticas y medios diagnósticos para aplicaciones *in vivo* de la presente invención típicamente comprenden una cantidad terapéuticamente o diagnósticamente eficaz de una proteína de unión y/o fusión según la invención y opcionalmente sustancias auxiliares tal como excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s). Dichas composiciones farmacéuticas se preparan de una manera bien conocida en las artes farmacéuticas. Un soporte o excipiente puede ser una material líquido que puede servir como un vehículo o medio para el principio activo. Los soportes y excipientes adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, estabilizantes, antioxidantes, sustancias reguladoras del pH, excipientes de liberación controlada. La preparación farmacéutica de la invención se pueden adaptar, por ejemplo, para uso parenteral y se pueden administrar al paciente en forma de soluciones o similares.

También se describe en el presente documento un método de tratamiento o diagnóstico, en donde una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o diagnóstica anterior se administra a un paciente en necesidad de ello, preferiblemente un paciente que padece o se sospecha que padece cáncer y/o enfermedades inflamatorias.

Al efectuar el tratamiento o diagnóstico de un sujeto que padece enfermedades, una proteína de unión o de fusión de la presente invención se puede administrar en cualquier forma o modo que haga el compuesto terapéutico o diagnóstico biodisponible en una cantidad eficaz, incluyendo rutas oral y parenteral. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa y similar. El experto en la materia en el campo de preparar formulaciones puede seleccionar fácilmente la forma y modo de administración apropiados dependiendo de las características particulares del producto seleccionado, la enfermedad o afección que se va a tratar o diagnosticar, la fase de la enfermedad o afección y otras circunstancias relevantes (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (1990)). Las composiciones de la presente invención se pueden administrar solas o en forma de una preparación farmacéutica o diagnóstica en combinación con soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables, cuya proporción y naturaleza están determinadas por la solubilidad y propiedades químicas del producto seleccionado, la ruta de administración elegida y práctica farmacéutica y diagnóstica estándar. Los productos de la presente invención, mientras que eficaces ellos mismo, se pueden formular y administrar en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como sales de adición ácida o sales de adición de base, para fines de estabilidad, conveniencia de cristalización, solubilidad aumentada y similares.

Figuras

La **figura 1** ilustra un análisis de transferencia en mancha. Se determinó el porcentaje de clones que expresan un cantidad detectable de mutantes de SH3 de Fyn solubles por análisis de transferencia en mancha en lisados de células bacterianas usando conjugado de anticuerpo anti-HIS-HRP (Sigma) como reactivo detector. La actividad peroxidasa se detectó usando el sistema de detección de inmunotransferencia ECL plus (Amersham).

- A) Mutantes de FynSH3 con bucle RT-Src aleatorizado
- B) Mutantes de FynSH3 con bucle n-Src extendido (4->6) y aleatorizado
- C) FynSH3 con bucles RT y n-Src aleatorizados.

La **figura 2** ilustra un ELISA en fago monoclonal. Después de la tercera ronda de adsorción contra MSA se probaron sobrenadantes bacterianos monoclonales de que contienen fagos que presentan mutantes de SH3 de Fyn por ELISA usando placas MaxiSorp (Nunc) recubiertos con MSA (100 µg/ml durante la noche, 100 µl por pocillo). Los fagos unidos se detectaron usando conjugados de anticuerpo anti-M-13-HRP (Amersham).

La **figura 3** ilustra un ELISA en fago monoclonal (contra MSA) después de una ronda de selección por maduración de afinidad usando placas MaxiSorp (Nunc) recubiertas con MSA (100 µg/ml durante la noche, 100 µl por pocillo)

- A) ELISA de fago de la primera sub-biblioteca de G4 (bucle n-Src aleatorizado y Trp37 y Tyr50). El clon parental G4 se indica con una flecha.
- B) ELISA de fago de la segunda sub-biblioteca de G4 (bucle n-Src aleatorizado y extendido). El clon parental G4 se indica con una flecha.
- C) ELISA de fago de la primera y segunda sub-biblioteca después de una ronda de adsorción, realizada en condiciones que favorecen los unidores con una k_{off} grande. El clon parental G4 se indica con una flecha.

La **figura 4** muestra el ELISA soluble (usando placas MaxiSorp (Nunc) recubiertas con MSA (100 µg/ml durante la noche, 100 µl por pocillo) de varios clones de unión a MSA, después de la clonación (vector pQE-12), expresión y purificación de la proteína soluble, según las instrucciones del fabricante (Qiagen, condiciones nativas). Como agentes detectores se usaron conjugados de anticuerpos anti-HIS-HRP. Como control se añadieron las mismas proteínas de unión a pocillos bloqueados con MPBS al 4% solo.

Figura 5. Especificidad de ELISA de proteína soluble. Se probaron mutantes del SH3 de Fyn que se unen a MSA seleccionados para la unión contra seroalbúmina humana (HSA), seroalbúmina de rata (RSA), seroalbúmina bovina (BSA) y ovoalbúmina usando placas MaxiSorp (Nunc) recubiertas con las diferentes albúminas (cada una 100 µg/ml durante la noche, 100 µl por pocillo).

Figura 6. Análisis por BIACore de D3. Concentraciones usadas: 4, 2, 1 y 0,5 μ M (desde arriba).

Figura 7. Análisis de ELISA de muestras de sangre para la presencia de anticuerpos murinos.

- 5
- A) Se recubrieron placas MaxiSorp (Nunc) con SH3 de Fyn (20 μ g/ml durante la noche, 100 μ l por pocillo). Se aplicaron muestras de sangre (que variaban de 75-200 μ l) de cada uno de los 5 ratones en series de diluciones (de 1:4 a 1:100). La detección de los anticuerpos se realizó usando conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP (Sigma). Como control de la eficacia de recubrimiento se usaron conjugados anti-HIS-HRP (Sigma).
- 10
- B) Se recubrieron placas MaxiSorp (Nunc) con SH3 D3 de Fyn (20 μ g/ml durante la noche, 100 μ l por pocillo). Se aplicaron muestras de sangre (que variaban de 75-200 μ l) de cada uno de los 5 ratones en series de diluciones (de 1:4 a 1:100). La detección de los anticuerpos se realizó usando conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP (Sigma). Como control de la eficacia de recubrimiento se usaron conjugados anti-HIS-HRP (Sigma).
- 15
- C) Se recubrieron placas MaxiSorp (Nunc) con scFv (60 μ g/ml durante la noche, 100 μ l por pocillo). Se aplicaron muestras de sangre (que variaban de 75-200 μ l) de cada uno de los 4 ratones en series de diluciones (de 1:4 a 1:100). La detección de los anticuerpos se realizó usando conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP (Sigma). Como control de la eficacia de recubrimiento se usaron conjugados anti-myc-HRP (Roche).
- 20

La **figura 8** muestra la inmunofluorescencia de D3 (Fig. 8.a), el correspondiente control negativo (8.b), la tinción con anti-CD31 (Fig. 8.c) y el correspondiente control negativo (8.d) en secciones histológicas de teratocarcinoma murino F9.

25

La **figura 9** muestra la retención tumoral de SH3-D3 de Fyn (Fig. 9.a)), mientras que no pudo observar acumulación para SH3wt de Fyn (Fig. 9.b). Los resultados de direccionamiento se expresan como % de la dosis inyectada de proteína marcada con 125 I retenido por g de tejido (% DI/g).

30

A continuación el objeto de la invención se describirá en más detalle con respecto a formas de realización específicas que no se pretende que se interpreten como limitantes del ámbito de la invención.

Ejemplos

35 Ejemplo 1: Expresión de mutantes de SH3 de Fyn

Con el fin de evaluar la expresión de mutantes del SH3 de Fyn se realizó un análisis de transferencia en mancha de tres sub-bibliotecas de SH3 de Fyn diferentes (Fig. 1): en la primera biblioteca solo se aleatorizó el bucle RT, en la segunda el bucle Src se aleatorizó y extendió hasta 6 residuos y en la tercera biblioteca el bucle RT y el Src se aleatorizaron simultáneamente, extendiéndose el último de bucle de 4 a 6 residuos. El porcentaje de mutantes de SH3 de Fyn expresados varió del 59-90%.

40

Tabla 1

Biblioteca	Mutantes expresados (%)	Número de clones probados
RT-Src	59	29
n-Src	90	29
RT-Src y n-Src	62	58

45 Ejemplo 2: Selecciones de presentación de fagos contra seroalbúmina de ratón

Se creó una biblioteca de 10^7 SH3 de Fyn diferentes (solo se aleatorizó el bucle RT) y se clonó en el vector fagémido pHEN1 (Hoogenboom et al. "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains", Nucleic Acids Res, 19(15):4133-7, 1991). La biblioteca se presentó en fagos y se realizaron 3 rondas de adsorción contra seroalbúmina da ratón (MSA). Después de la tercera ronda, se realizó el cribado para proteínas de unión por ELISA en fago monoclonal; se detectaron 13 clones positivos (Fig. 2). La secuenciación de los 13 clones reveló que dos secuencias diferentes estaban enriquecidas, indicadas G4 y C4.

50

Sin embargo, después de la subclonación y expresión de G4 en el vector pQE-12 (Qiagen, expresión y purificación según el manual del fabricante en condiciones nativas) la unión de la proteína hacia MSA no se pudo detectar por ELISA (Fig. 4) debido a la baja afinidad (el ELISA en fago es más sensible que el ELISA de la proteína soluble). Por tanto, la secuencia de G4 se usó para dos bibliotecas de maduración de afinidad diferentes (tamaño: 10^7 clones para cada biblioteca). En la primera, los 4 residuos del bucle n-Src y los residuos Trp37 (SEQ ID NO: 1) y Tyr50 (SEQ ID NO. 1) se aleatorizaron, en la segunda el bucle n-Src se extendió de 4 a 6 residuos aleatorizados. Después de una ronda de adsorción carios clones de ambas sub-bibliotecas dieron señales más fuertes en ELISA en fago comparados con el clon parental G4 (Fig. 3). Después de la subclonación y expresión de varios clones la unión de la proteína soluble se confirmó por ELISA (Fig. 4). Las constantes de disociación aparentes estaban en el intervalo de

60

100 nM (determinado por BIAcore). Algunos de los clones tenían reactividad cruzada con otras seroalbúminas (probadas: seroalbúmina humana (HSA), seroalbúmina de rata (RSA), seroalbúmina bovina (BSA) y ovoalbúmina), mientras que otros clones eran muy específicos para MSA, lo que indica que es posible aislar proteínas de unión muy específicas (Fig. 5).

Ejemplo 3: Selecciones por presentación en fagos contra el dominio extracelular b de fibronectina (ED-B)

Se eligió ED-B como una proteína diana para demostrar la capacidad para seleccionar unidores derivados del SH3 de Fyn contra una proteína farmacéuticamente relevante. ED-B es un dominio de homología de tipo III de 91 aminoácidos que se inserta en la molécula de fibronectina por un mecanismo de ajuste alternativo a nivel del transcrito primario siempre que tiene lugar la remodelación de tejido (Zardi et al., "Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon". *Embo J.* 6(8): 2337-42, 1987). Es un buen marcador de cualidad de angiogénesis que se sobreexpresa en una variedad de tumores sólidos (por ejemplo, carcinoma de células renales, carcinoma colorrectal, carcinoma hepatocelular, astrocitomas de alto grado, tumores de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, etc.) pero es virtualmente indetectable en tejido adulto normal (excepto para el endometrio en la fase proliferativa y algunos vasos en los ovarios). (Para más detalles sobre ED-B como diana véase Menrad y Menssen, "ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments". *Expert Opin. Ther. Targets* 9(3): 491-500, 2005).

Se preparó una biblioteca de más de 1 mil millones de mutantes del SH3 de Fyn y se presentó en fagos (aleatorización simultánea de los bucles RT-*Src* y n-*Src*). Después de tres rondas de adsorción contra ED-B se identificaron 3 clones de unión por ELISA en fago. La secuenciación reveló dos secuencias diferentes (dones indicados B11 y D3). La constante de disociación de D3 se determinó por análisis de interacción en tiempo real de resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento BIAcore3000 y mostró un valor de $8,5 \times 10^8$ M (Figura 6).

D· (SEQ ID NO: 3)

```
GVTLFVALYDYHAQSGADLSFHKGEKFQILKFRGKGDWWEARSLTTGETGYIPSNYV
APVDSIQ
```

Ejemplo 4: Inmunogenicidad

La inmunogenicidad de las proteínas es una de las principales desventajas en terapias de proteína, especialmente para tratamientos que implican administraciones repetitivas de un fármaco. Debido a la conservación de la secuencia del SH3 de Fyn en ratones y hombres se investigó el potencial inmunógeno de la proteína de tipo salvaje FynSH3 (Fyn SH3wt) y un mutante del SH3 de Fyn (Fyn SH3D3, un unidor contra ED-B) *in vivo* inyectando 5 ratones repetidamente con las dos proteínas. Los ratones se inyectaron 4 veces (cada tres días) con 20 µg de proteína. Un día después de la 4ª inyección los ratones se sacrificaron y se tomaron muestras de sangre para examinar la presencia o ausencia de anticuerpos murinos anti-Fyn SH3wt y anti-Fyn SH3D3. Como control positivo 4 ratones se inyectaron (puntos temporales de inyección iguales y dosis iguales (= 60 µg)) con un anticuerpo humano en formato Fv de cadena sencilla (scFv). Sin embargo, un ratón del grupo de scFv murió 20 minutos después de la tercera inyección y los otros 3 casi mueren, de modo que las muestras de sangre se tomaron ya después de la tercera inyección. Las figuras 7 a y b demuestran que no hubo anticuerpos detectables contra Fyn SH3wt y Fyn SH3D3, mientras se observaron señales fuertes para el grupo control (Fig. 7c).

Ejemplo 5: Inmunohistofluorescencia

Para explorar si Fyn SH3-D3 (D3, un unidor contra ED-B) reconoce su diana en la conformación nativa en el tejido, se realizó inmunofluorescencia en secciones de teratocarcinoma F9. La figura 8 ilustra que D3 se unía al estroma del tumor alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 8.a). La detección se realizó con conjugado anticuerpo anti-His-Alexa488. En el control negativo, no se añadió proteína D3 (Fig. 8b). Para visualizar los vasos sanguíneos, las mismas secciones se cotiñeron con un anticuerpo de rata anti-CD31 de ratón y como anticuerpo secundario se usó un conjugado de anticuerpo asno anti-rata Alexa594 (fig. 8.c). El control negativo se hizo usando el anticuerpo secundario sin el anticuerpo primario (Fig. 8.d).

Ejemplo 6: Biodistribución cuantitativa *in vivo*

Se evaluaron los rendimientos de direccionamiento *in vivo* de Fyn SH3-D3 (un unidor contra ED-B) y Fyn SH3 de tipo salvaje (un no unidor a ED-B) por experimentos de biodistribución en ratones portadores de un teratocarcinoma murino F9 injertado s.c. Puesto que ED-B es idéntica en ratón y hombre los resultados de los estudios de direccionamiento al tumor deben ser predictivos del rendimiento de D3 en seres humanos. Se inyectaron D3 y SH3wt marcadas con 125 I i.v. y 24 horas después, los animales se sacrificaron, los órganos se cortaron, pesaron y se contó la radioactividad. La figura 9.a muestra que D3 se acumuló selectivamente en el tumor (las proporciones

tumor:órganos variaban de 3:1 10:1), mientras que no se pudo observar enriquecimiento para la proteína de tipo salvaje Fyn SH3 (Fig. 9.b).

Lista de secuencias

- 5 <110> Eidgenoessische Technische Hochschule Zuerich
- <120> Proteínas de unión específicas y de alta afinidad que comprenden dominios SH3 modificados de la quinasa FYN
- 10 <130> 50027PCT
- <160> 3
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 63
- <212> PRT
- 20 <213> Homo sapiens
- <400> 1
- Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Thr Glu
1 5 10 15
- Asp Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
20 25 30
- Ser Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
- Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60
- 25 <210> 2
- <211> 63
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 30 <400> 2
- Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Ile Thr Glu
1 5 10 15
- Asp Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
20 25 30
- Ser Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
35 40 45
- Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60
- <210> 3
- <211> 65
- 35 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Variante del dominio SH3 de la quinasa Fyn con alta afinidad al dominio ED-B de fibronectina
- 40 <400> 3

ES 2 548 438 T3

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr His Ala Gln Ser Gly
1 5 10 15

Ala Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Lys Phe
20 25 30

Gly Arg Gly Lys Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly
35 40 45

Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile
50 55 60

Gln
65

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión recombinante que tiene una afinidad de unión específica a una proteína o péptido, en donde dicha proteína o péptido no es un ligando de unión a SH3 natural, que comprende al menos un derivado del dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN, en donde
- (a) al menos un aminoácido en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle src y
 (b) al menos un aminoácido en o localizado hasta dos aminoácidos adyacentes al bucle RT,
- se sustituyen, delecionan o añaden, en donde el derivado del dominio SH3 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en donde dicho derivado del dominio SH3 tiene al menos el 85% de identidad a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que representa el dominio de homología 3 de Src (SH3) de la quinasa FYN fuera de los bucles src y RT y con la condición de que la proteína recombinante no sea una proteína que contiene un dominio SH3 natural existente en la naturaleza.
2. La proteína de unión según la reivindicación 1, que comprende al menos dos derivados del dominio SH3, preferiblemente una proteína de unión bivalente.
3. La proteína de unión según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende uno o preferiblemente dos residuos alterados en las posiciones 37 y/o 50 del derivado del dominio SH3, preferiblemente dos residuos alterados hidrofóbicos, más preferiblemente Trp37 y/o Tyr50, siendo lo más preferido Trp37 y Tyr50.
4. La proteína de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene una afinidad de unión específica de 10^{-7} a 10^{-12} M, preferiblemente de 10^{-8} a 10^{-12} M, al dominio extracelular de fibronectina oncofetal (ED-B).
5. La proteína de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
6. Una proteína de fusión que comprende una proteína de unión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 fusionada a un componente farmacéuticamente y/o diagnósticamente activo.
7. La proteína de fusión según la reivindicación 6, en donde dicho componente se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) citoquinas, preferiblemente citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN alfa, IFN beta, IFN gamma, IL-10, IL-15, IL-24, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, LIF, CD80, B70, TNF beta, LT-beta, ligando CD-40, ligando Fas, TGF-beta, IL-1alfa e IL-1 beta;
- (ii) compuestos tóxicos, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños o polipéptidos, preferiblemente compuestos tóxicos seleccionados del grupo que consiste en caliqueamicina, neocarcinostatina, esperamicina, dinemicina, kedarcidina, maduropeptina, doxorubicina, daunorubicina, auristatina, cadena A de Ricina, modeccina, exotoxina A de Pseudomonas truncada, toxina de la difteria y gelonina recombinante
- (iii) quimioquinas, preferiblemente quimioquinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-8, GRO alfa, GRO beta, GRO gamma, ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2, PF4, Mig, IP-10, SDF-1alfa/beta, BUNZO/STRC33, I-TAC, BLC/BCA-1, MIP-1alfa, MIP-1 beta, MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1, HCC-4, DC-CK1, MIP-3 alfa, MIP-3 beta, MCP-1-5, Eotaxina, Eotaxina-2, I-309, MPIF-1, 6Ckine, CTACK, MEC, Linfotactina y Fractalquina;
- (iv) colorantes fluorescentes, preferiblemente un componente seleccionado de los colorantes Alexa Fluor o Cy;
- (v) fotosensibilizadores, preferiblemente bis(trietanolamina)Sn(IV) clorinae6 (SnChe6);
- (vi) factores procoagulantes, preferiblemente factores tisulares;
- (vii) enzimas para la activación de profármacos, preferiblemente enzimas seleccionadas del grupo que consiste en carboxipeptidasas, glucuronidasas y glucosidasas;
- (viii) radionúclidos bien del grupo de emisores gamma, preferiblemente ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , o del grupo de emisores de positrones, preferiblemente ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I , o del grupo de emisores beta, preferiblemente ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{67}Cu , o del grupo de emisores alfa, preferiblemente ^{213}Bi , ^{211}At ; y
- (viii) dominios Fc funcionales, preferiblemente dominios Fc funcionales humanos.
8. La proteína de fusión según la reivindicación 6 o 7, que comprende además un componente que modula la semivida en suero, preferiblemente un componente seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), inmunoglobulina y péptidos que se unen a albúmina.
9. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende la proteína de unión según la reivindicación 5 o 6.

10. Un polinucleótido que codifica una proteína de unión o una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 5 11. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 10.
12. Una célula huésped que comprende un polinucleótido según la reivindicación 10 y/o un vector según la reivindicación 11.
- 10 13. Uso de una proteína de unión o de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para preparar un medicamento o medio diagnóstico, preferiblemente un medicamento para el tratamiento del cáncer o un medio diagnóstico para el diagnóstico de cáncer.
- 15 14. Una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende una proteína de unión o de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1 a)

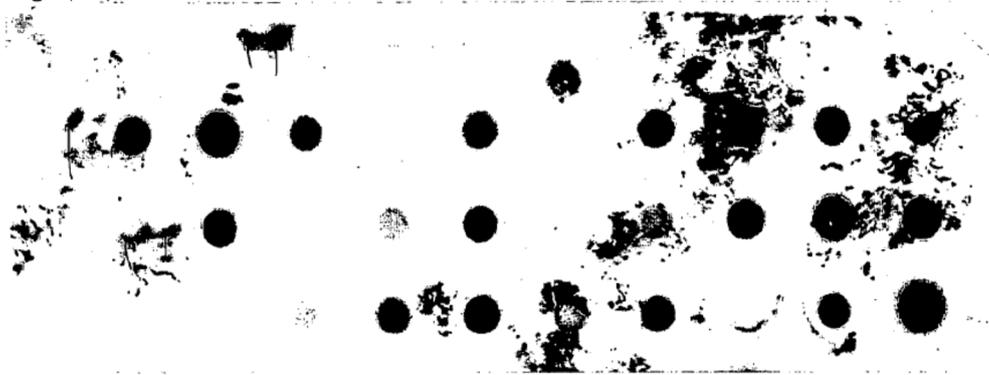


Fig. 1 b)

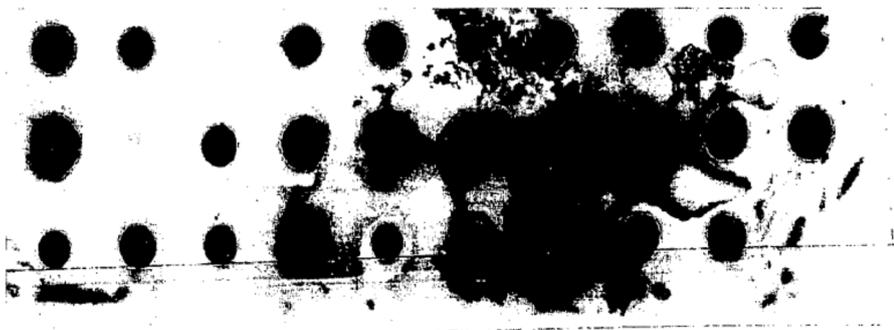


Fig. 1 c)

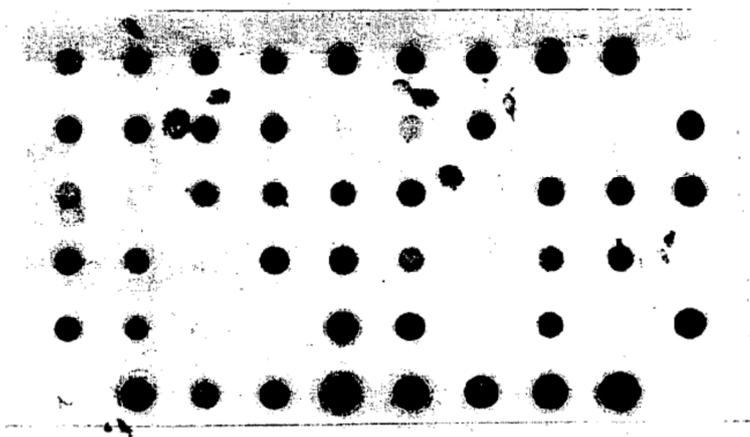
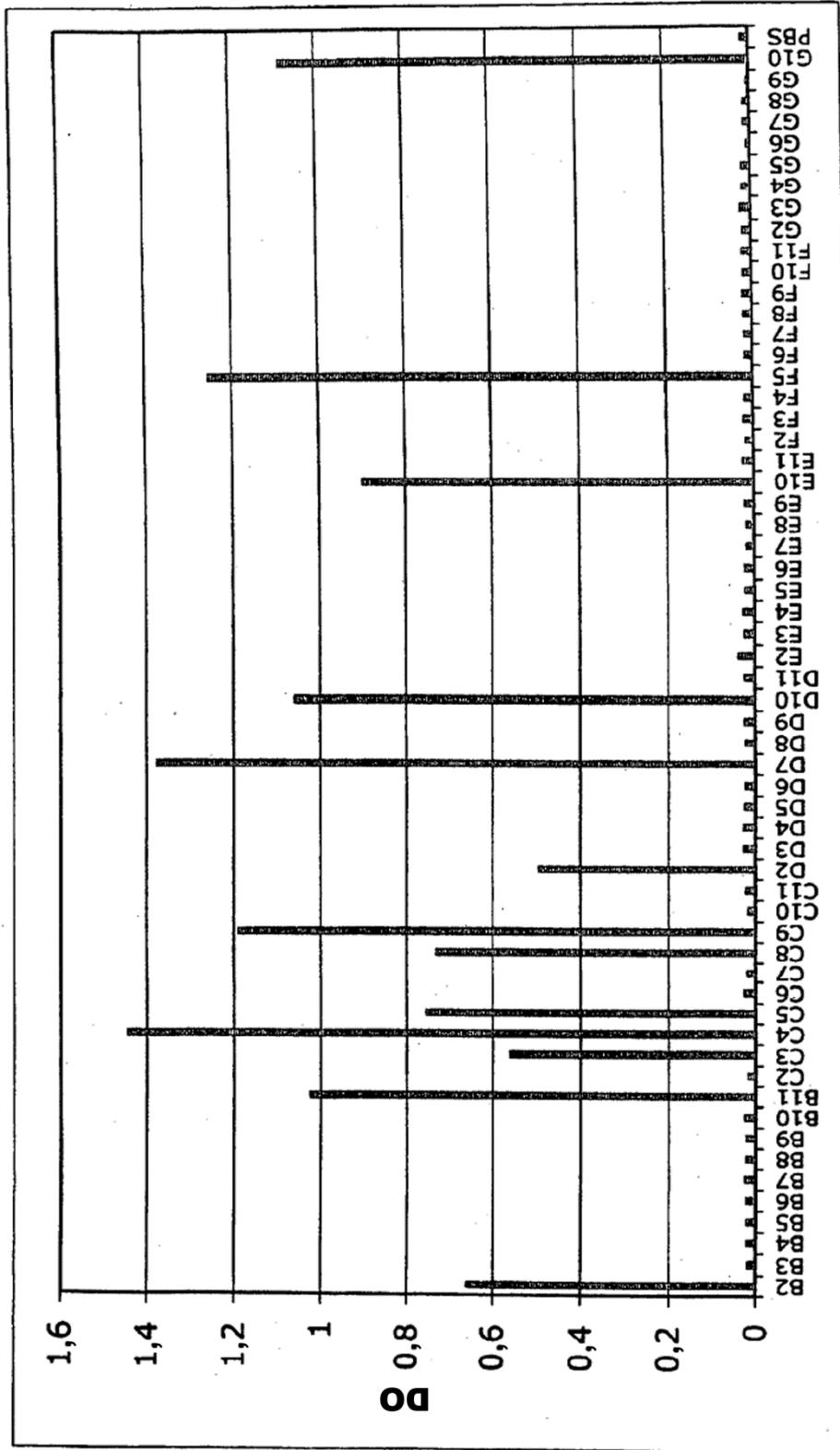


Fig. 2



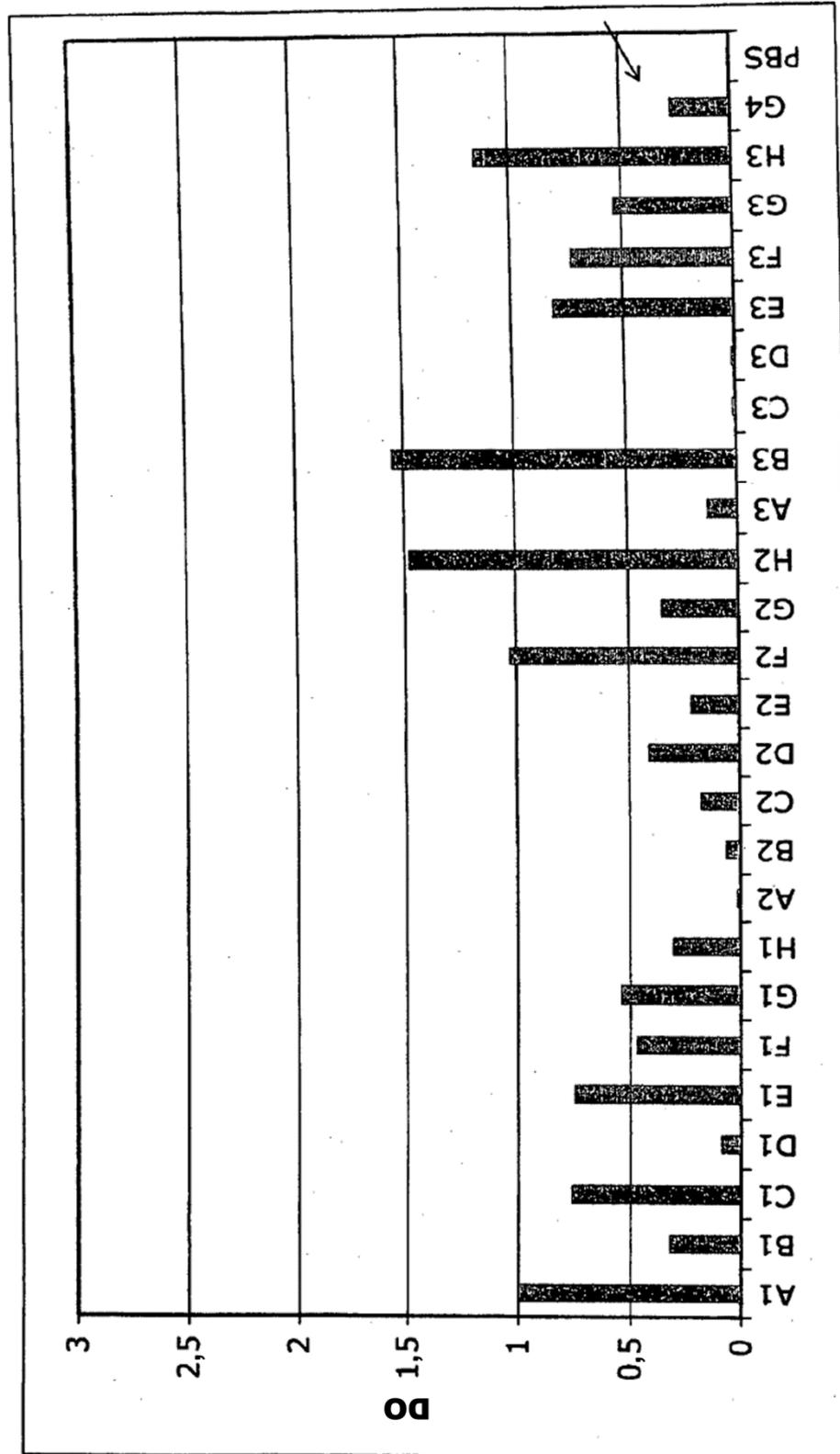
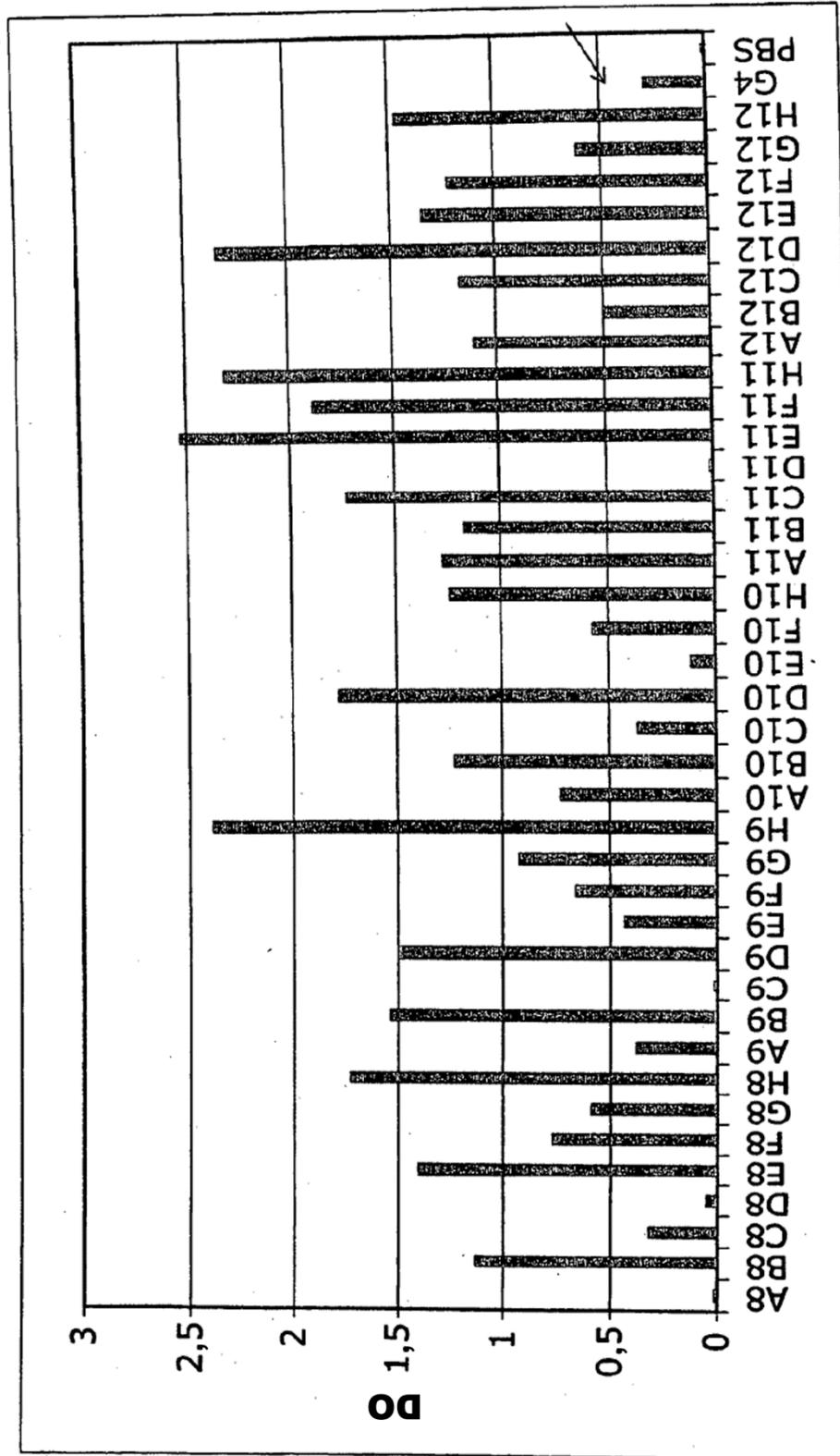


Fig. 3a)

Fig. 3 c)



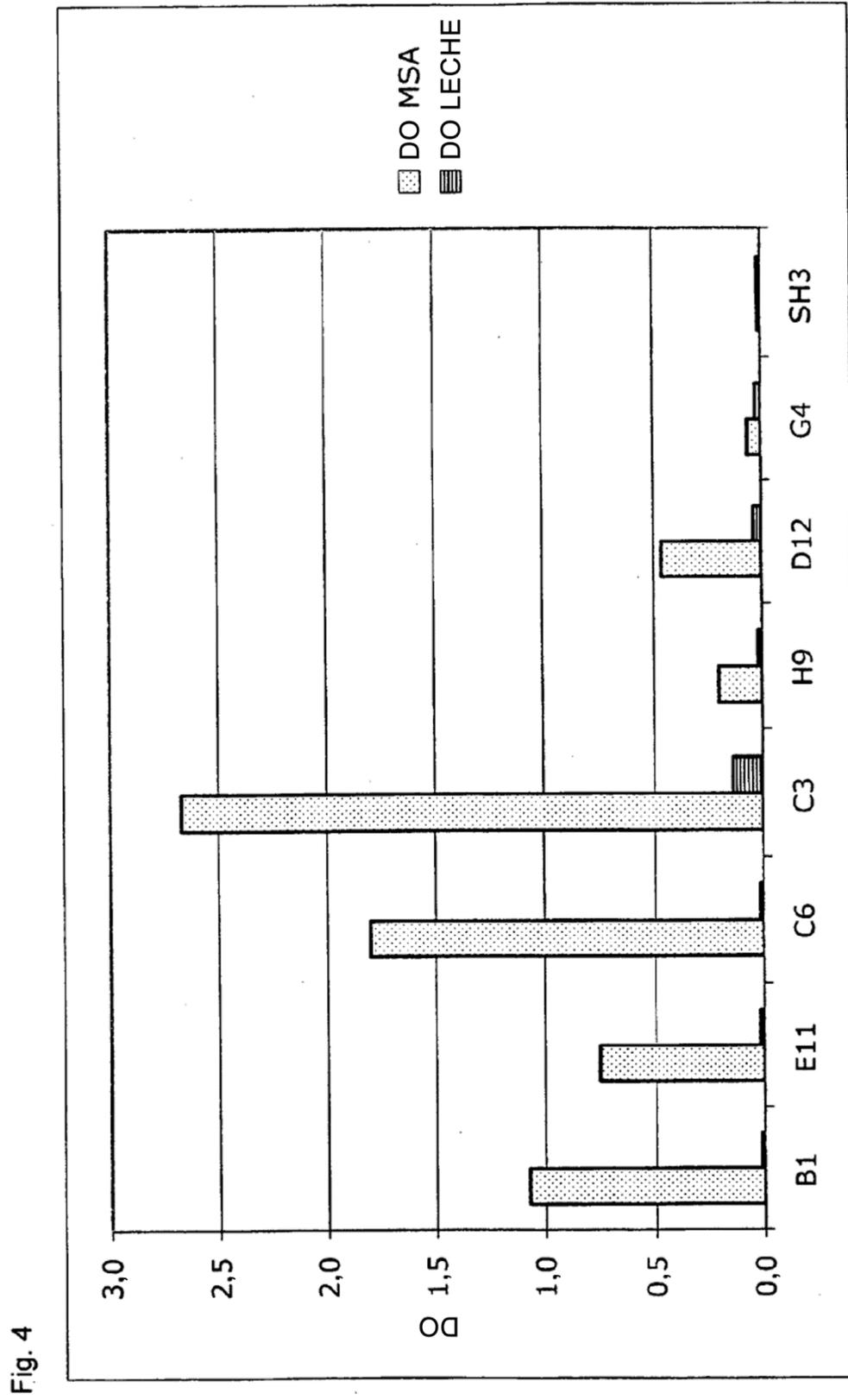
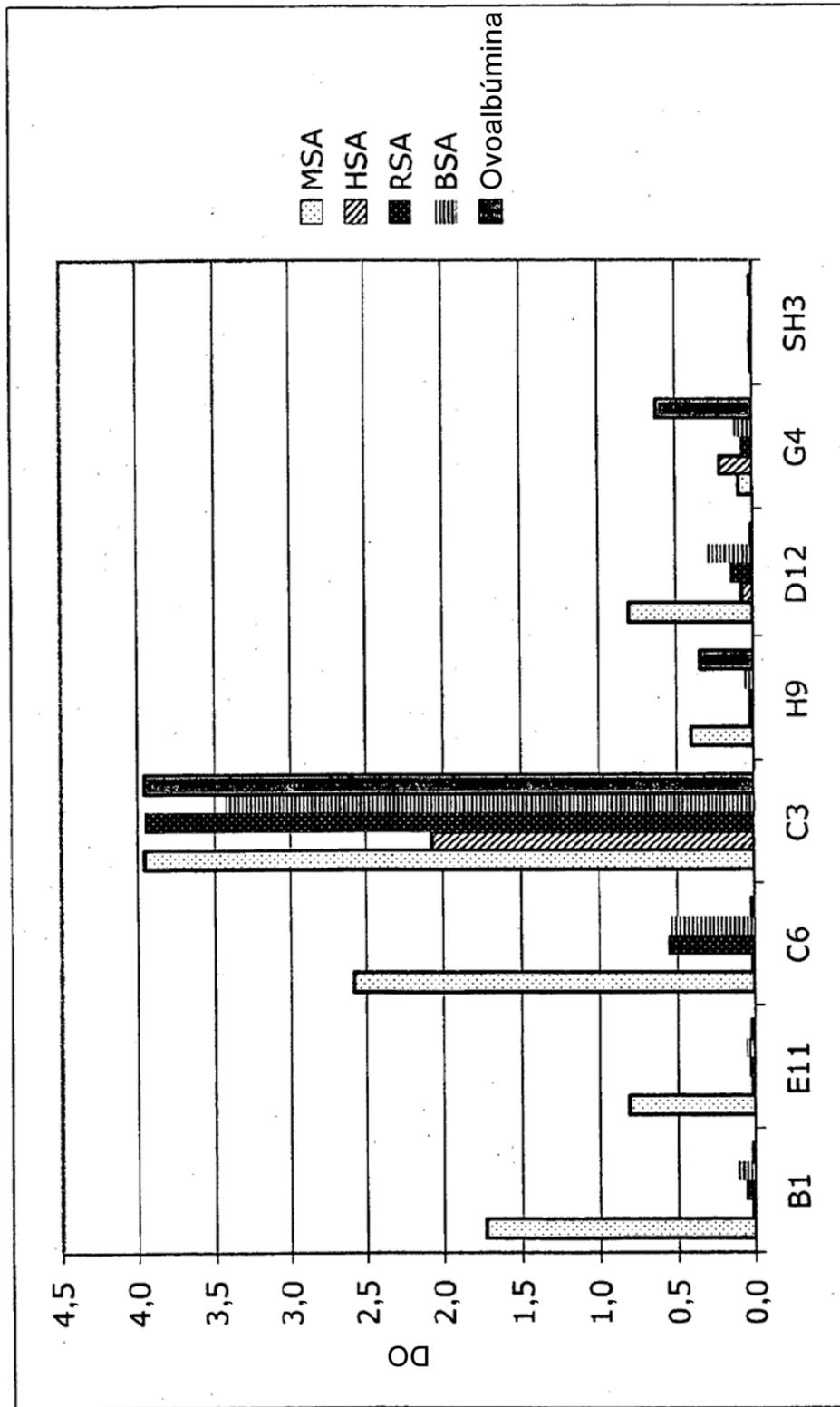


Fig. 5



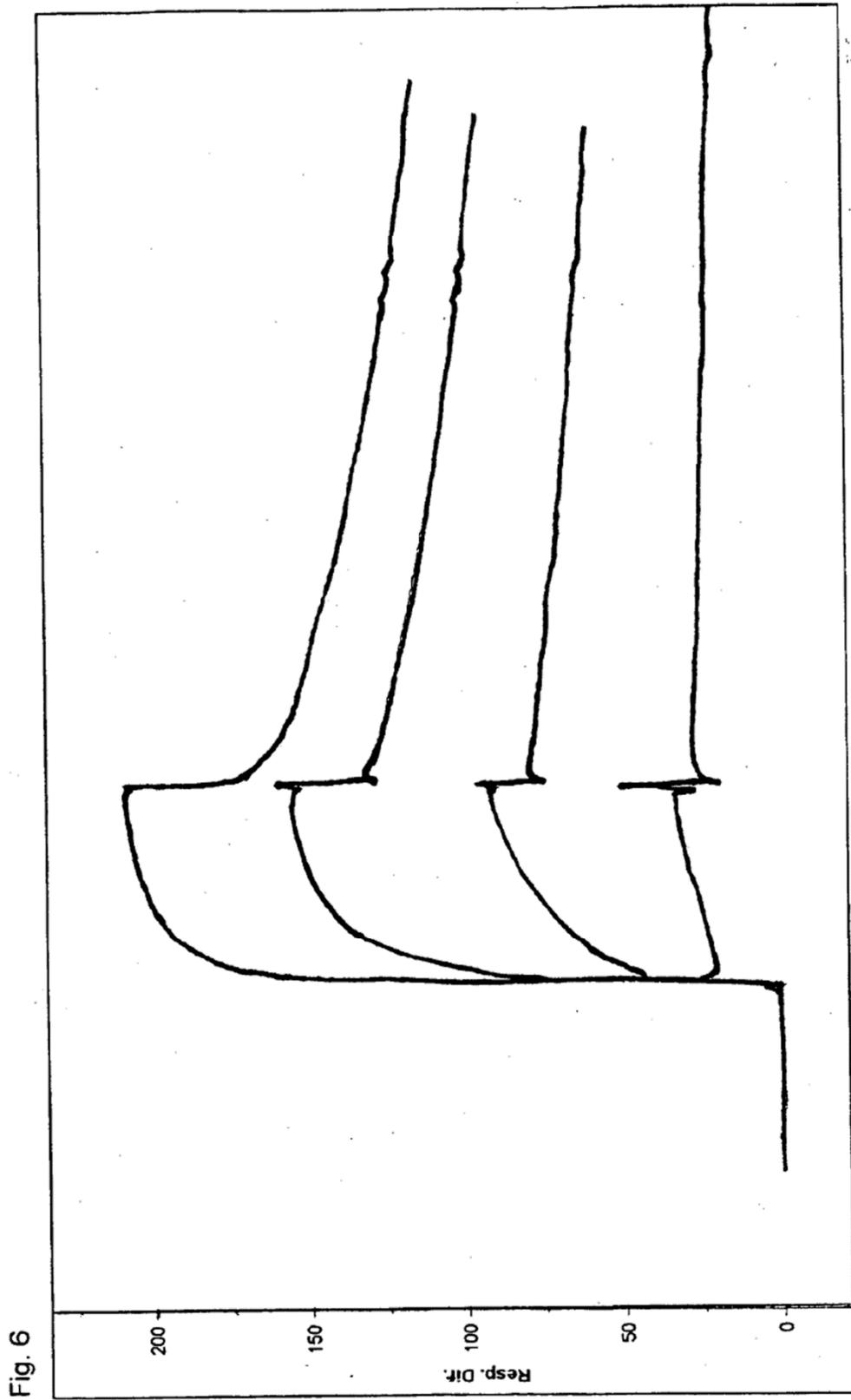


Fig. 6

Fig. 7 a)

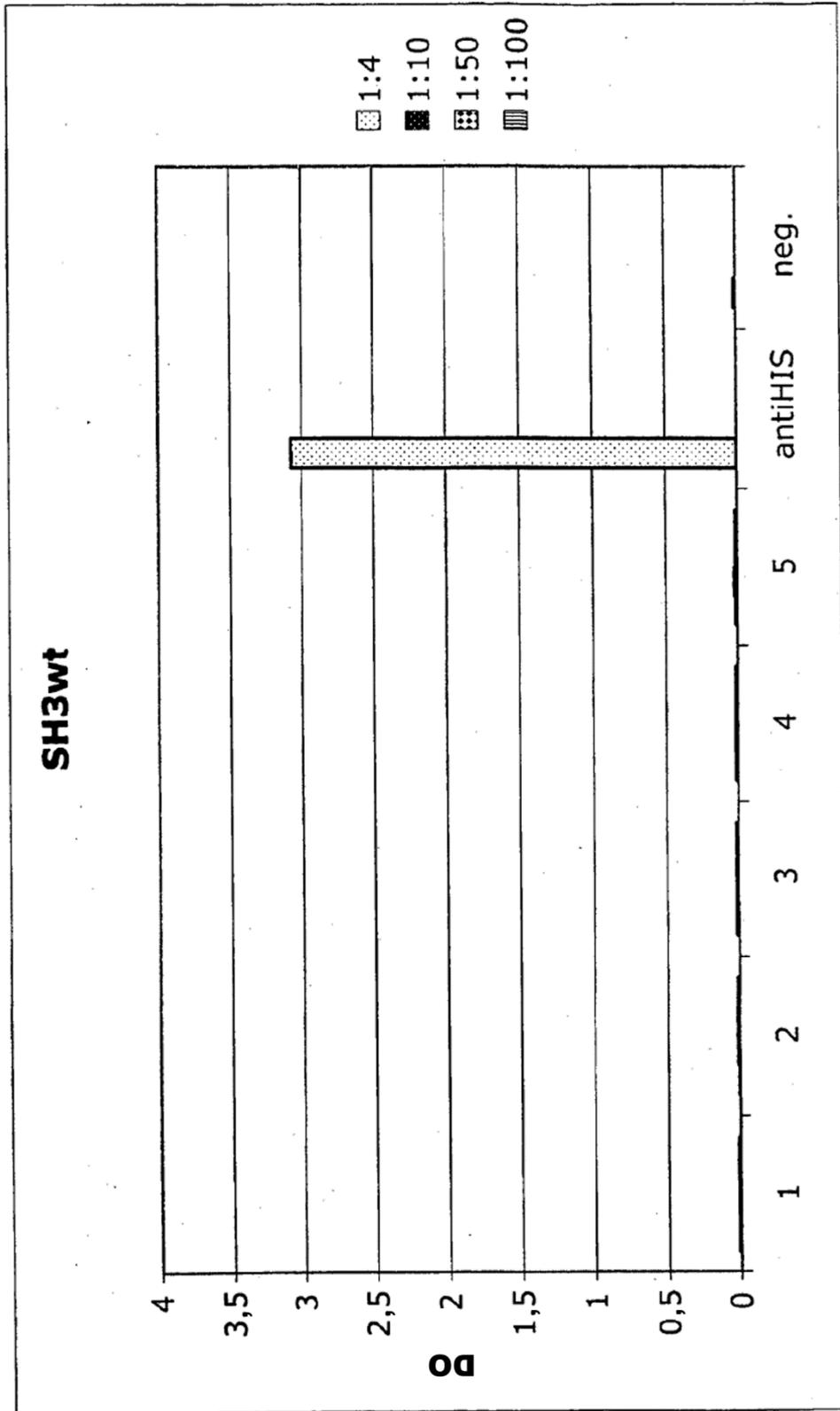
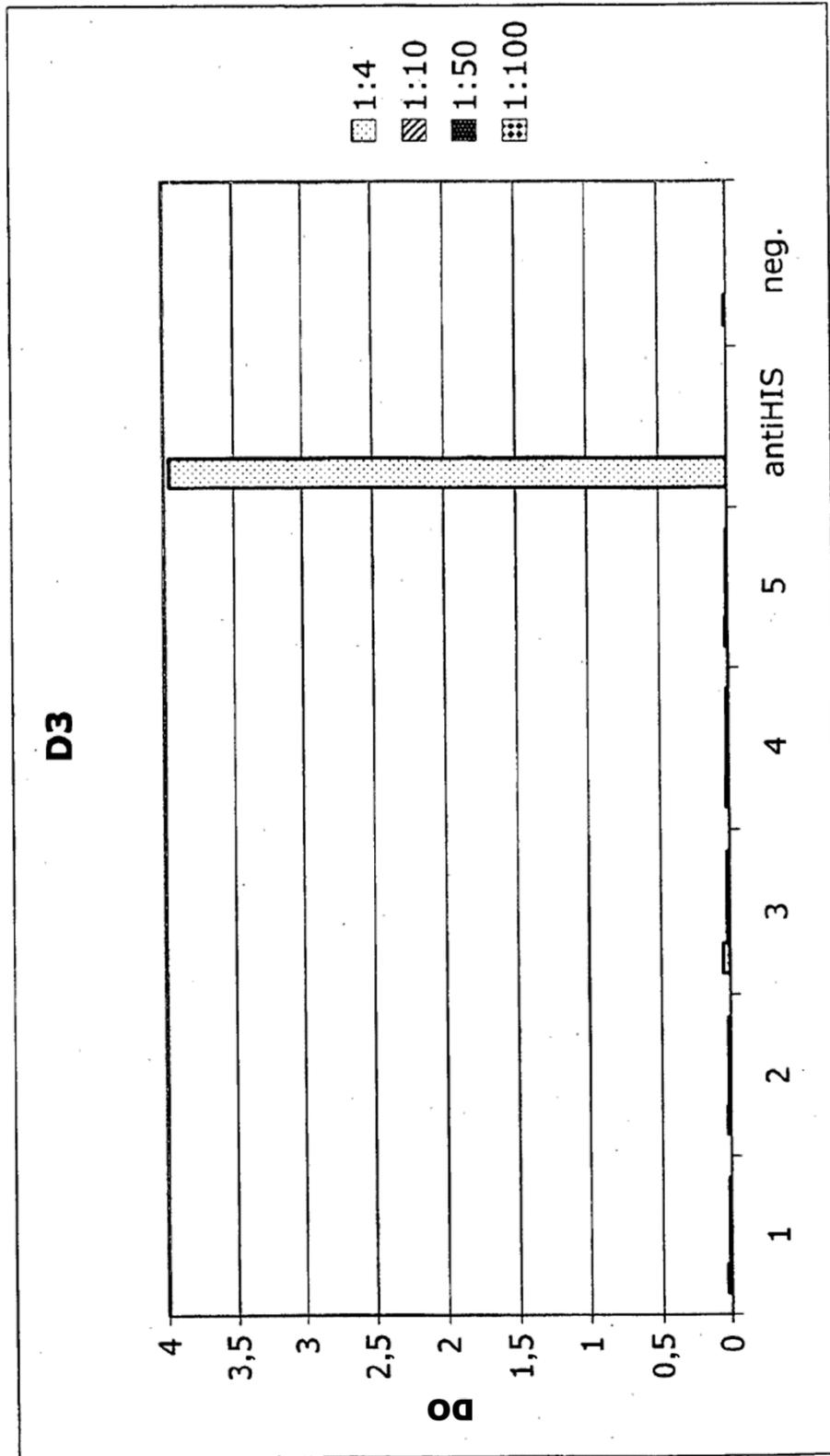


Fig. 7 b)



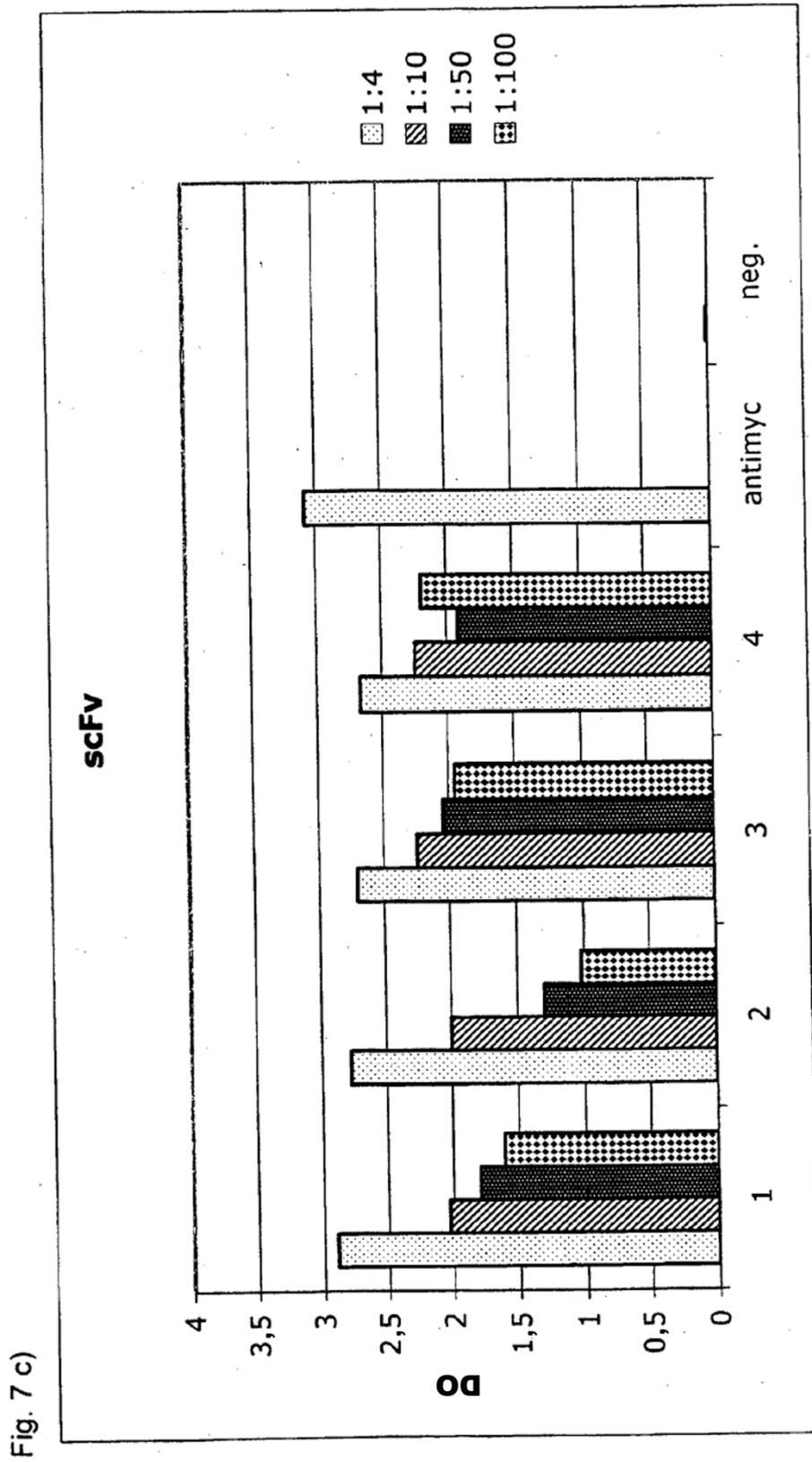


Fig. 8 a)

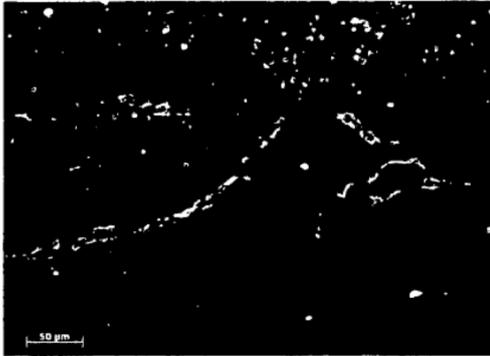


Fig. 8 c)

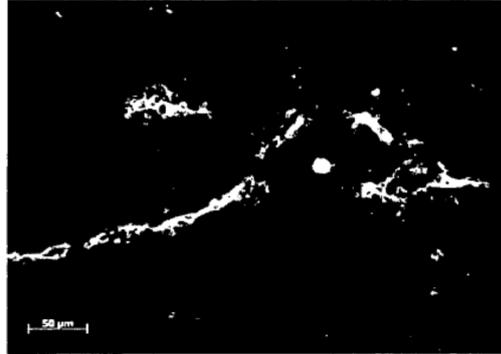


Fig. 8 b)

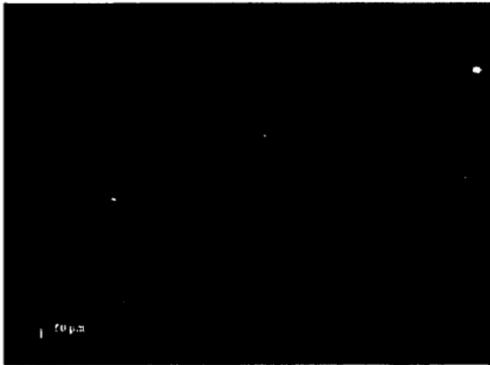


Fig. 8 d)

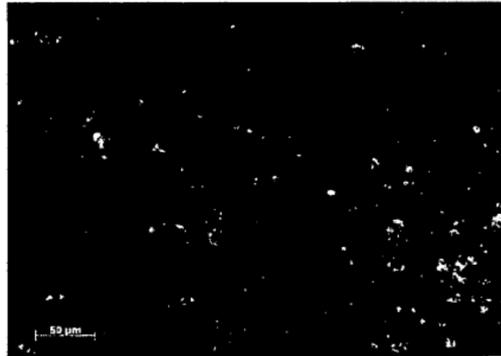


Fig. 9. a)

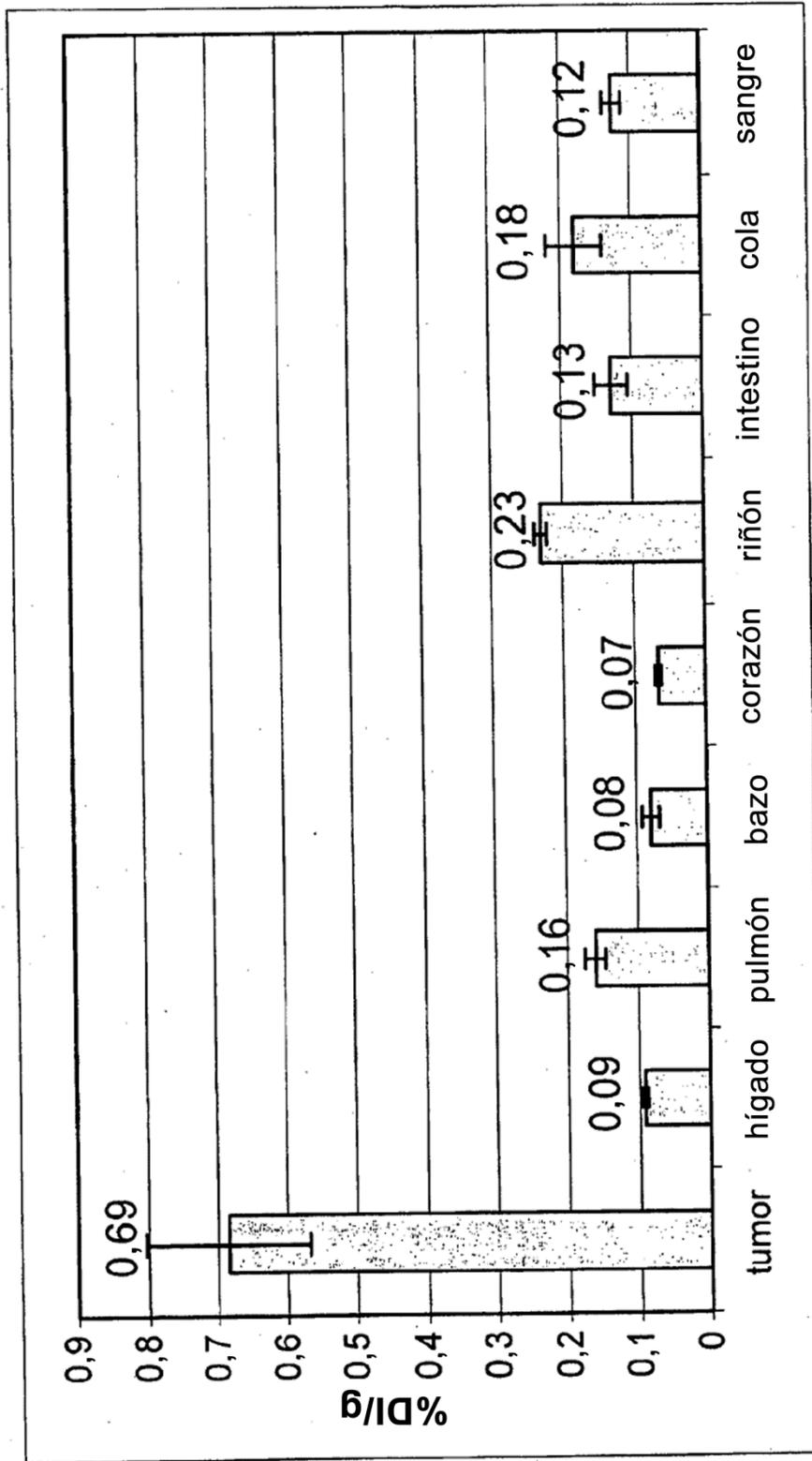


Fig. 9. b)

