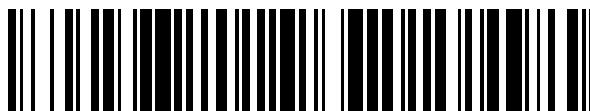


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 769**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/073 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2010 PCT/US2010/025768**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10099536**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2010 E 10746976 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2403530**

54 Título: **Proteínas modificadas con alta afinidad por quelatos de DOTA**

30 Prioridad:

27.02.2009 US 156467 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2016

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(100.0%)
77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**DAVIS, KELLY J. y
WITTRUP, K. DANE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 589 769 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 modificadas con alta afinidad por quelatos de DOTA

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de prioridad de la solicitud provisional de EEUU n.º 61/156.467, que se presentó el 27 de febrero, 2009.

Declaración sobre la investigación con fondos federales

Esta invención se realizó con el apoyo gubernamental con el número de subvención 5-R01-CA101830 concedida por the National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes

Las estrategias de tratamiento del cáncer tradicionales incluyen quimioterapia, radiación con haces externos y extirpación quirúrgica. La quimioterapia no es específica y se dirige a todas las células que se dividen con rapidez, lo cual produce efectos secundarios indeseables. Además, los tumores pueden volverse resistentes a la quimioterapia. La radiación con haces externos y la cirugía solo pueden dirigirse a sitios tumorales conocidos, y no pueden tratar metástasis indetectables. En la última década, el desarrollo de productos terapéuticos de anticuerpos dirigidos ha conseguido unas mejoras significativas en el tratamiento del cáncer, aumentando el número de respuestas al tratamiento de pacientes para varios tipos de cánceres (Hudson y Souriau, *Nat. Med.*, 9:129-134, 2003; Nayeem y Khan, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 7:165-170, 2006; Tassev y Cheung, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 9:341-353, 2009; y Weiner *et al.*, *Lancet*, 373:1033-1040, 2009).

Sumario

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína modificada multiespecífica que comprende una primera secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina, una proteína de andamiaje, o una porción de unión al antígeno de una inmunoglobulina o una proteína de andamiaje que se une específicamente a una molécula diana, y una segunda secuencia de aminoácidos de un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une específicamente a un quelato de metal que comprende DOTA, o uno de sus variantes activos, en la que el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 1-244 de SEQ ID NO:11 en la figura 3, según se representa en SEQ ID NO:12.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los inventores de proteínas de unión a quelatos-DOTA versátiles. Las proteínas pueden ser monoespecíficas y unirse selectivamente solo a un quelato de metal que comprende DOTA (o un variante activo de DOTA) y un ion metálico. Como alternativa, las proteínas pueden ser multiespecíficas y se unen a una diana celular o molecular y a un quelato de metal que comprende DOTA (o un variante activo de DOTA) complejoado con un ion metálico. La diana puede variar y las dianas adecuadas incluyen antígenos del cáncer, moléculas pequeñas (por ejemplo, un compuesto farmacológicamente activo o inerte, tal como un tinte u otro marcador) y proteínas expresadas por una célula eucariota, una célula procariota o un virus. Aunque se emplea el término "antígeno" o "antígenos" cuando se describen ciertas moléculas diana, hay que señalar que no se prevé ni se requiere una respuesta inmunológica concreta. En otras palabras, no es necesario que un antígeno del cáncer sea un antígeno que normalmente suscite una respuesta inmunológica concreta en un sujeto; cualquier molécula, incluyendo una proteína o un antígeno del cáncer basado en una proteína, que sea expresada exclusivamente por una célula cancerosa o una célula tumoral puede actuar como diana para las proteínas modificadas de la presente invención. De modo similar, cualquier molécula, incluyendo una proteína o una molécula basada en una proteína que sea expresada exclusivamente por un patógeno (por ejemplo, una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de un parásito o un virus) puede actuar como diana para una proteína modificada de la invención, independientemente de la respuesta inmunológica que esta molécula pueda o no suscitar en un sujeto tras la infección.

Por consiguiente, la invención incluye una proteína modificada (por ejemplo, un scFv, otra inmunoglobulina, o una proteína de andamiaje) que se une específicamente a (a) un quelato de metal que comprende DOTA, o uno de sus variantes activos, y un metal (sin unirse también a una segunda diana), o (b) una molécula diana y un quelato de metal que comprende DOTA, o uno de sus variantes activos, y un metal. En cualquiera de los casos, la proteína modificada puede ser una proteína que se une al quelato de metal con alta afinidad (por ejemplo, una afinidad que sea mayor que la afinidad con la cual el anticuerpo representado en SEQ ID NO:1 se une al quelato de metal). La SEQ ID NO:1 es:

QVKLQESGPG	LVQPSQSLSI	TCTVSGFSLT	DYGVHWVRQS	PGKGLEWLGV	50
IWSGGGTATY	AAFISRLNIY	KDNSKNQVFF	EMNSLQANDT	AMYYCARRGS	100
YPYNYFDVWG	QGTTVTIVSSG	GGSGGGGSG	GGGSQAVVTQ	ESALTTSPGE	150
TVTTLTCSRST	GAVTTSNYAN	WVQEKPDHLE	TGLIGNNNR	PPGVPARFSG	200
SLIGDKAALT	IAGTQTEDEA	IYFCALWYSN	HWVFGGGFRG	RVLG	244

Los restos 1-119 representa la cadena pesada variable del anticuerpo denominado 2D12.5 (Corneillie *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 125:15039-15048, 2003); los restos 120-134 representan un conector; y los restos 135-244 representan la cadena ligera variable de 2D12.5.

La proteína modificada puede ser una proteína de fusión que incluye una primera secuencia de aminoácidos que se une a la diana, y una segunda secuencia de aminoácidos que se une al quelato de metal. Como alternativa, la proteína modificada puede configurarse como un complejo de proteínas (por ejemplo, un complejo de proteínas unido covalentemente, tal como un anticuerpo tetrámero o un anticuerpo biespecífico, tal como el bsAb que se indica como ejemplo a continuación). La primera secuencia de aminoácidos o la segunda secuencia de aminoácidos puede ser una inmunoglobulina, una proteína de andamiaje, o una porción de unión al antígeno de una inmunoglobulina o una proteína de andamiaje, y estos tipos de proteínas de unión pueden ser incorporados de diversa forma, según se hayan configurado las proteínas modificadas como una proteína de fusión, un complejo de proteínas, o una de sus combinaciones (por ejemplo, cuando una o más proteínas de fusión forman complejos entre sí o con otros polipéptidos). Cuando se emplea una inmunoglobulina, o su porción de unión al antígeno, esta puede ser una inmunoglobulina humana o humanizada, o su porción de unión al antígeno (por ejemplo, de la clase IgG).

Las inmunoglobulinas incluyen anticuerpos estructurados de modo convencional (por ejemplo, una IgG tetrámera convencional), sus fragmentos de unión al antígeno, y anticuerpos monocatenarios. Cuando la proteína modificada es o incluye un scFv que se une a un quelato de metal, la secuencia puede ser al menos o aproximadamente 70% (por ejemplo, al menos o aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98%) idéntica a SEQ ID NO:1, excluyendo el conector en los restos 120-134. Los inventores especifican que la identidad puede calcularse excluyendo al conector, puesto que muchas secuencias de conectores diferentes son adecuadas y pueden ser incorporadas cuando la proteína modificada es o incluye un scFv. La secuencia de una proteína modificada de la presente invención, o una secuencia que se encuentre en su interior, también puede mostrar un cierto porcentaje de identidad con las regiones de cadena ligera o pesada de SEQ ID NO:1. Por ejemplo, una proteína modificada de la presente invención puede incluir una secuencia de aminoácidos que sea al menos o aproximadamente 70% (por ejemplo, al menos o aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98%) idéntica a la región de cadena ligera o a la región de cadena pesada de SEQ ID NO:1. Las proteínas derivadas de SEQ ID NO:1 se pueden denominar como “maduradas por afinidad.”

Cuando la secuencia de una proteína modificada de la presente invención, o una secuencia que se encuentre en su interior, es similar a SEQ ID NO:1, ciertos restos aminoácidos pueden permanecer invariables. Por ejemplo, los restos aminoácidos que se ponen en contacto con el quelato de metal pueden ser invariables (por ejemplo, los restos que se corresponden con una o más de las posiciones 35, 50, 52, 53, 98, 99, 101, 104, 168, 170, y 186 de SEQ ID NO:1 pueden ser invariables). Cuando se introducen mutaciones, estas pueden encontrarse a menos de aproximadamente 5 Å de un resto aminoácido que se pone en contacto con el quelato de metal, dentro de la segunda cubierta o dentro de la tercera cubierta. De modo más específico, las proteínas modificadas de la presente pueden incluir una mutación en una posición que se corresponde con una o más de las siguientes posiciones dentro de SEQ ID NO:1: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 47, 48, 49, 51, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 69, 71, 73, 94, 95, 96, 97, 102, 103, 105, 106, 107, 164, 165, 166, 167, 169, 171, 172, 184, 185, 188, 189, 223, 224, 225, 226, 228, 229, 230, 231, 233, y 234. Como alternativa, o además, las proteínas modificadas (por ejemplo, un scFv o un complejo de proteínas o proteína que contiene scFv) pueden incluir una mutación en una posición que se corresponde con una o más de las siguientes posiciones dentro de SEQ ID NO:1: 60, 61, 63, 71, 80, 88, 108, 139, 157, 165, 187, 230, y 234. Como alternativa, o además, las proteínas modificadas de la presente pueden incluir una mutación en una posición que se corresponde con una o más de las siguientes posiciones dentro de SEQ ID NO:1: 100, 187, y 227.

De forma más específica, las proteínas modificadas de la presente pueden incluir la secuencia de los restos 1-244 de los mutantes C8.2-1 (SEQ ID NO:4); C8.2-2 (SEQ ID NO:6); C8.2-3 (SEQ ID NO:8); C8.2-4 (SEQ ID NO:10); C8.2-5 (SEQ ID NO:12); C8.2-6 (SEQ ID NO:14); C7.3 1 (SEQ ID NO:16); C7.3 2 (SEQ ID NO:18); C7.3 3 (SEQ ID NO:20); C7.3 4 (SEQ ID NO:22); C7.3 5 (SEQ ID NO:24); C7.3 6 (SEQ ID NO:26); C7.3 7 (SEQ ID NO:28); C7.3 8 (SEQ ID NO:30); C7.3 9 (SEQ ID NO:32); o C7.3 10 (SEQ ID NO:34).

En realizaciones concretas, las proteínas modificadas pueden configurarse en un formato de anticuerpo biespecífico (bsAb), en el que un scFv, opcionalmente estabilizado con enlaces disulfuro, se condensa con el C-terminal de una o ambas de las cadenas ligeras de una IgG. Así, las proteínas modificadas pueden ser anticuerpos bifuncionales (o biespecíficos) de IgG-scFv. Cuando se incluyen anticuerpos tetrámeros en las proteínas modificadas de la presente, las proteínas se pueden denominar como moléculas “similares a inmunoglobulinas” o “similares a IgG”. Cuando se expresan en células de mamífero y se purifican (por ejemplo, mediante una cromatografía de proteína A de una sola etapa), los anticuerpos biespecíficos pueden conservar las afinidades parentales de cada dominio de unión, mostrar una estabilidad similar a IgG, y mostrar una eliminación de la sangre y un transporte dirigido al tumor similar a IgG *in vivo*. Los estudios de los inventores han demostrado que la cadena ligera de una IgG puede extenderse con un scFv sin afectar a la función y la estabilidad de la IgG. Así, este formato puede actuar como plataforma estandarizada para la construcción de anticuerpos biespecíficos funcionales.

Cualquiera de las proteínas descritas en la presente puede incluir una región Fc, que puede prolongar la semivida en circulación de la proteína. Las moléculas similares a IgG que conservan dominios Fc también pueden provocar una mayor captación tumoral que la observada con fragmentos más pequeños. Las proteínas modificadas también

pueden incluir una mutación que atenúe la glicosilación (por ejemplo, una mutación en el sitio de glicosilación N-enlazado (por ejemplo, la posición 88 de SEQ ID NO:1) o cerca de este y/o restos cisteína que facilitan la formación de un enlace disulfuro (por ejemplo, las proteínas pueden ser o pueden incluir una inmunoglobulina (por ejemplo, un scFv) que tenga un resto cisteína en el fragmento ligero variable (V_L) y un resto cisteína en el fragmento pesado variable (V_H), de modo que se forma un enlace disulfuro entre una cadena pesada y una cadena ligera de la inmunoglobulina). Cuando las proteínas modificadas incluyen variantes de SEQ ID NO:1, el resto cisteína en V_L puede estar colocado en la posición 179, y el resto cisteína en V_H puede encontrarse en la posición 111.

Las proteínas modificadas descritas en la presente pueden unirse a un quelato de metal con una K_d de aproximadamente 1 pM-1 nM (por ejemplo, aproximadamente 1-10 pM; 1-100 pM; 5-50 pM; 100-500 pM; o 500 pM-1 nM).

El ion metálico dentro del quelato de metal unido por la proteína modificada puede ser un catión metálico trivalente y puede ser un radionúclido (por ejemplo, un emisor beta, un emisor alfa o un emisor de electrones de baja energía) o un metal paramagnético. De modo más específico, el ion metálico puede ser actinio, bismuto, cobre, europio, gadolinio, galio, indio (por ejemplo, ^{111}In), lutecio (por ejemplo, ^{177}Lu), terbio, o itrio (por ejemplo, ^{86}Y).

El quelato de metal también puede estar conjugado con una molécula pequeña, un tinte, biotina, un polipéptido o dextrano.

Se ha indicado anteriormente que las proteínas modificadas de la invención pueden ser proteínas de fusión, en las que una primera secuencia de aminoácidos se une a una diana, y una segunda secuencia de aminoácidos se une a un quelato de metal. Cuando la diana es un antígeno del cáncer, este puede ser, sin limitación, el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno A33, HER-2/neu, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, MUC-1, N-acetilglucosaminiltransferasa, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, o el antígeno del cáncer 125 (CA-125). Algunos cánceres están asociados con una infección vírica, bacteriana o parasitaria, y la diana también puede ser un antígeno expresado por el virus, la bacteria o el parásito atacante.

A continuación se describen más a fondo los variantes activos de DOTA (por ejemplo, los variantes que cumplen la fórmula I). Un "variante activo" mostrará una unión suficiente de un ion metálico para ser útil en lugar de DOTA.

También se encuentran dentro del alcance de la presente invención las moléculas de ácidos nucleicos que codifican toda o una porción de las proteínas modificadas descritas en la presente (por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar la primera secuencia de aminoácidos o la segunda secuencia de aminoácidos). También se incluyen vectores de expresión (por ejemplo, plásmidos) que comprenden estos ácidos nucleicos, y células hospedantes que incluyen los ácidos nucleicos *per se* o vectores de expresión que los incluyen.

Cualquiera de las proteínas modificadas de la presente puede ser formulada para la administración como composiciones de diagnóstico o terapéuticas. Cuando se configuran para fines terapéuticos, las composiciones pueden emplearse para tratar un sujeto al que se le ha diagnosticado un trastorno proliferativo (por ejemplo, cáncer u otro crecimiento celular no deseado) o una enfermedad infecciosa (es decir, una enfermedad provocada por un patógeno). Por consiguiente, la presente invención incluye métodos que comprenden una primera etapa de administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que incluye una proteína modificada según se describe en la presente (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que se dirige a una célula que está proliferando de una manera no deseada o un agente infeccioso). En una segunda etapa, se administra un radionúclido que porta un hapteno, que se dirige al virus o a la célula de interés en virtud de un sitio de unión específica sobre la proteína modificada. La primera y la segunda etapa pueden realizarse de modo secuencial, y la segunda etapa puede realizarse horas o días (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más días) después de la primera etapa. Si se espera a que la proteína modificada haya alcanzado la diana antes de administrar la radiación se podrían conseguir unas dosis diana más altas (por ejemplo, tumor) y unas dosis no específicas más bajas.

Los inventores también han desarrollado un agente de bloqueo basado en dextrano que reduce la unión de DOTA a proteínas modificadas residuales (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos residuales) en la sangre. Cuando se emplea este agente, los métodos de diagnóstico o tratamiento descritos en la presente incluyen las etapas de administrar una proteína modificada (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), administrar el agente de bloqueo basado en dextrano, y administrar el DOTA radiomarcado. El agente de bloqueo y las composiciones fisiológicamente aceptables que lo incluyen también se describen en la presente. Este agente comprende aminodextrano conjugado con DOTA. Por ejemplo, el agente de bloqueo puede ser un aminodextrano de 500 kDa conjugado con DOTA. En general, el compuesto resultante puede incluir aproximadamente 100-150 (por ejemplo, aproximadamente 130) moléculas de DOTA por dextrano.

Cualquiera de las proteínas modificadas de la presente puede ser formulada para la administración como composiciones de diagnóstico o farmacéuticas. Cuando se configuran para fines terapéuticos, las composiciones pueden emplearse para tratar un sujeto al que se le ha diagnosticado un trastorno proliferativo (por ejemplo, cáncer u otro crecimiento celular no deseado) o una enfermedad infecciosa. Por consiguiente, en la presente se describen métodos para administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que incluye una proteína

modificada que se une específicamente a una molécula diana (por ejemplo, un antígeno del cáncer o un resto expresado por un agente infeccioso) y DOTA. Así, la composición se dirige específicamente a células dianas que están proliferando de una manera indeseable o a un agente infeccioso dentro del sujeto. La primera secuencia de aminoácidos se dirige específicamente a la célula o al virus, y se une específicamente a un antígeno expresado sobre ellos. Debido a que las composiciones también incluyen una segunda secuencia de aminoácidos que se une específicamente a un quelato de metal que comprende DOTA, los haptenos radiactivos administrados posteriormente se dirigen específicamente a la célula o virus diana (a lo cuales la proteína modificada ya se ha unido). Las composiciones pueden utilizarse, por ejemplo, con los emisores beta ^{177}Lu e ^{90}Y , MRI dirigidos con agentes de contraste macromoleculares multivalentes que contienen DOTA-Gd, y terapia de captura de neutrones con ^{157}Gd .

Cuando se configuran para fines diagnósticos, las composiciones pueden emplearse para diagnosticar un sujeto sospechoso de padecer un trastorno proliferativo (por ejemplo, cáncer u otro crecimiento celular no deseado) o una enfermedad infecciosa. Las composiciones pueden emplearse para centellografía externa en una diversidad de formas, dependiendo de la sensibilidad requerida y la localización de la lesión sospechosa. Los ejemplos de métodos incluyen la formación de imágenes prelocalizadas con tomografía de emisión de positrones empleando ^{86}Y , y tomografía computerizada de emisión de un solo fotón que emplea ^{111}In .

Las proteínas modificadas también son útiles en esquemas de purificación, puesto que pueden ser inmovilizadas (por ejemplo, sobre una esfera o resina utilizadas en una columna o fundamentalmente cualquier sustrato sólido) y emplearse para unirse específicamente a quelatos de DOTA.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se indican en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A y la FIG. 1B son gráficas que muestran un análisis de la retención de haptenos en tumores como función de la afinidad de unión de haptenos. Se realizaron simulaciones de PRIT suponiendo un tumor vascularizado (FIG. 1A) y una pequeña micrometástasis (FIG. 1B) con parámetros farmacocinéticos humanos. La concentración de hapteno en el tumor como una función del tiempo se representó gráficamente para diversas constantes de disociación (indicadas por flechas). La actividad acumulada para un radionúclido de ^{90}Y se tabula para diversos valores de K_D y también para una k_{off} teórica igual a cero. Las unidades de actividad acumulada son gigabecquerel segundos (GBq s) para el tumor vascularizado, y megabecquerel segundos (MBq s) para la micrometástasis.

La FIG. 2 muestra las estructuras químicas de los variantes de DOTA empleados con cationes metálicos trivalentes.

La FIG. 3 es una representación de las secuencias de mutantes obtenidas a partir de una selección de maduración por afinidad de 2D12.5 scFV (SEQ ID NO:1). 2ddsg2 es la secuencia de aminoácidos de 2D12.5 scFV con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 88 (N88E), 111 (Q111C), y 179 (L179C) (SEQ ID NO:2). Los puntos representan el mismo resto que la secuencia 2ddsg2. Diversas secuencias mutantes son: mutante C8.2-1 (representado por SEQ ID NO:3; los restos 1-244 de SEQ ID NO:3 están representados por SEQ ID NO:4); C8.2 2 (representado por SEQ ID NO:5; los restos 1-244 de SEQ ID NO:5 están representados por SEQ ID NO:6); C8.2 3 (representado por SEQ ID NO:7; los restos 1-244 de SEQ ID NO:7 están representados por SEQ ID NO:8); C8.2 4 (representado por SEQ ID NO:9; los restos 1-244 de SEQ ID NO:9 están representados por SEQ ID NO:10); C8.2 5 (representado por SEQ ID NO:11; los restos 1-244 de SEQ ID NO:11 están representados por SEQ ID NO:12); C8.2 6 (representado por SEQ ID NO:13; los restos 1-244 de SEQ ID NO:13 están representados por SEQ ID NO:14); C7.3 1 (representado por SEQ ID NO:15; los restos 1-244 de SEQ ID NO:15 están representados por SEQ ID NO:16); C7.3 2 (representado por SEQ ID NO:17; los restos 1-244 de SEQ ID NO:17 están representados por SEQ ID NO:18); C7.3 3 (representado por SEQ ID NO:19; los restos 1-244 de SEQ ID NO:19 están representados por SEQ ID NO:20); C7.3 4 (representado por SEQ ID NO:21; los restos 1-244 de SEQ ID NO:21 están representados por SEQ ID NO:22); C7.3 5 (representado por SEQ ID NO:23; los restos 1-244 de SEQ ID NO:23 están representados por SEQ ID NO:24); C7.3 6 (representado por SEQ ID NO:25; los restos 1-244 de SEQ ID NO:25 están representados por SEQ ID NO:26); C7.3 7 (representado por SEQ ID NO:27; los restos 1-244 de SEQ ID NO:27 están representados por SEQ ID NO:28); C7.3 8 (representado por SEQ ID NO:29; los restos 1-244 de SEQ ID NO:29 están representados por SEQ ID NO:30); C7.3 9 (representado por SEQ ID NO:31; los restos 1-244 de SEQ ID NO:31 están representados por SEQ ID NO:32); C7.3 10 (representado por SEQ ID NO:33; los restos 1-244 de SEQ ID NO:33 están representados por SEQ ID NO:34).

La FIG. 4 es una gráfica que muestra los resultados de un análisis de eliminación de la sangre de haptenos basados en ^{111}In -DOTA.

La FIG. 5 es una gráfica que muestra los resultados de un análisis de la estabilidad de anticuerpos biespecíficos a 37°C .

La FIG. 6 es un esquema que ilustra el proceso de una radioinmunoterapia prelocalizada.

La FIG. 7 también es un esquema que ilustra un PRIT con un anticuerpo bifuncional.

La FIG. 8 es un esquema que ilustra el diseño de una proteína de fusión de scFv C-terminal de cadena ligera de IgG. La cadena ligera está modificada con una fusión de scFv con el C-terminal, mientras que se conserva una cadena pesada totalmente inalterada.

5 Descripción detallada

La U.S. Food and Drug Administration aprobó el primer anticuerpo monoclonal para un uso terapéutico en 1986 y aprobó el primer anticuerpo directamente radiomarcado para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano en 2002. En este campo en expansión rápida se han identificado anticuerpos para una gran diversidad de dianas, mediante el método tradicional *in vivo* de inocular animales con un antígeno diana y seleccionar clones de hibridoma, y mediante el uso *in vitro* de bancos y métodos de selección, tales como presentación de fagos y levaduras. Se ha empleado la evolución dirigida empleando técnicas de biología molecular, tal como PCR propensa a errores, reordenamiento de ADN y mutagénesis de saturación, para generar diversidad, y métodos de selección, tal como inmunoadsorción de fagos y clasificación celular activada por fluorescencia, para madurar por afinidad los anticuerpos para mejorar la unión en varias veces a varios órdenes de magnitud.

Se han diseñado anticuerpos multiespecíficos para que contengan varios sitios de unión y, así, reconocer más de un epitopo sobre el mismo antígeno o múltiples antígenos. Aunque los anticuerpos han tenido éxito en el entorno clínico para una diversidad de enfermedades, los anticuerpos multiespecíficos pueden mejorar aún más la eficacia e introducir otros mecanismos de acción terapéutica. Los anticuerpos multiespecíficos se han modificado para 1) dirigir células tumorales a células efectoras inmunológicas a través de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), 2) dirigirse a múltiples receptores de la superficie celular asociados a tumores para bloquear la activación del receptor y para reticular los receptores para inducir una infrarregulación, y 3) prelocalizar células tumorales para la administración de radionúclidos, fármacos y profármacos.

Los anticuerpos biespecíficos se sintetizaron por primera vez coexpresando dos anticuerpos con diferentes especificidades a través de la conjugación química de dos anticuerpos, o sus fragmentos, o con la técnica del hibridoma híbrido. Las condiciones necesarias para la conjugación química pueden inactivar, desplegar o agregar el anticuerpo biespecífico. La técnica del hibridoma híbrido no solo produce el anticuerpo biespecífico deseado, sino que también produce productos no deseados procedentes del desapareamiento de las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras, y por tanto requiere complejos esquemas de purificación. En 1996, Carter y colaboradores publicaron un método de botón en ojal ("knobs into holes"), en el que la interfase del dominio pesado constante 3 (CH3) se modifica en un anticuerpo parental para que tenga un resto aminoácido grande y, en el otro anticuerpo parental, para que tenga un resto aminoácido pequeño. Estas mutaciones complementarias impiden estéricamente la homodimerización y aumentan el rendimiento de los heterodímeros de cadena pesada, aumentando así el rendimiento del anticuerpo biespecífico deseado. En la última década se han sintetizado diferentes formatos de anticuerpos multiespecíficos mediante métodos recombinantes y de "dock and lock", que mejoran aún más los rendimientos y la facilidad de fabricación.

El trabajo de los inventores trata sobre proteínas de unión a DOTA mono-específicas, así como proteínas modificadas, tales como anticuerpos multi- o biespecíficos, para aplicaciones de radioinmunoterapia prelocalizada (PRIT). La PRIT desacopla la farmacocinética del transporte dirigido de anticuerpos y la administración de radionúclidos, y la técnica ha demostrado aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad en modelo preclínicos (Kraeber-Bodere *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 47:247-255, 1999; Axworthy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:1802-1807, 2000; Gautherot *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 41:480-487, 2000; Pagel *et al.*, *Blood* 101:2340-2348, 2003; Sharkey *et al.*, *Cancer Res.*, 63:354-363, 2003; Karcay *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11:7879-7885, 2005) y en modelos clínicos (Knox *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:406-414, 2000; Kraeber-Bodere *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5(10 supl.):3183s-3189s, 2006). En la PRIT convencional, el anticuerpo se administra primero y se deja que se una al receptor de la superficie diana sobre las células del cáncer. Después se administra un radionúclido quelado que es "capturado" por el anticuerpo retenido en el sitio del cáncer. Con este proceso en dos etapas, la molécula de radionúclido pequeña se difunde con rapidez a través del cuerpo y es eliminada muy rápido, lo cual reduce significativamente la radiación no específica asociada con anticuerpos directamente conjugados.

Los primeros anticuerpos biespecíficos para la prelocalización emplearon conjugados de estreptavidina/anticuerpo y han demostrado pruebas de concepto prometedoras. Sin embargo, recientes trabajos de prelocalización no han empleado estreptavidina debido a su inmunogenicidad, alta captación del riñón y problemas con la biotina endógena. Se han empleado varios formatos biespecíficos que no utilizan estreptavidina para aplicaciones de prelocalización, que incluyen formatos de Fab y (Fab)₂ químicamente conjugados, anticuerpos biespecíficos de hibridoma híbrido, fusiones de anticuerpos recombinantes y scFv, y "dock and lock" de tri-Fab. Las presentes proteínas modificadas incluyen anticuerpos biespecíficos que no solo se unen simultáneamente a una diana (por ejemplo, un antígeno del cáncer) y a un radionúclido de molécula pequeña, sino que también conservan el dominio de unión de Fc, puesto que esto producirá una retención plasmática prolongada y, por consiguiente, una mayor penetración del tumor. El dominio de unión de Fc también puede provocar funciones inmunológicas secundarias que pueden incurrir en más beneficios terapéuticos. Los inventores también están interesados en un formato biespecífico que no requiere la optimización de la construcción para cada nuevo par de dominios de unión. Este formato proporcionaría una

plataforma para construir múltiples anticuerpos biespecíficos que podrían utilizarse para explorar diversas dianas de antígenos tumorales y capturar una diversidad de haptenos de molécula pequeña.

En la presente se presenta, entre otros, un formato de anticuerpo biespecífico similar a IgG. Esta construcción de anticuerpo biespecífico se expresa como una fusión de scFv al C-terminal de la cadena ligera de una IgG, creando un agente biespecífico con dos sitios de unión a diana (por ejemplo, sitios de unión a tumor) y dos sitios de captura de haptenos. Se presentan varios anticuerpos biespecíficos con este formato y se demuestra que se unen simultáneamente a su respectivo antígeno de la superficie celular y hapteno soluble. Las construcciones pueden producirse en células de mamífero, ser purificadas mediante una cromatografía de proteína A y mostrar una retención de las afinidades y estabildades parentales.

El formato biespecífico se diseñó como una fusión de scFv al C-terminal de una IgG. La cadena pesada es la misma que la de una IgG1 y se subclonó en el vector de expresión de mamífero gWiz (Aldevron n.º de cat. 5008) entre los sitios de restricción PST1 y SAL1 como VH-CH1-CH2-CH3. Los dominios constantes son los de una IgG1 humana. La cadena ligera se construye como FLAG-VL-V_K-(G₄S)₂-scFv-cmyc y se subclonó en un vector de expresión de mamífero distinto, gWiz, también entre los sitios de restricción PST1 y SAL1. La construcción biespecífica se expresó de modo transitorio en células HEK293 (Invitrogen n.º de cat. 11625-019). Las células HEK293 se cultivaron en matraces en una plataforma de agitación orbital que gira a 140 rpm a 37°C, 5% de CO₂. Las células HEK293 se subcultivaron siguiendo los protocolos del fabricante. Se realizó una cotransfección de los plásmidos de cadena pesada y ligera con polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección. Brevemente, el día antes de la transfección, las células HEK293 se subcultivaron hasta una densidad celular de 0,5-0,07 x 10⁶ células/ml. Aproximadamente 24 horas después, las células se cultivaron hasta 1,1-1,5 x 10⁶ células/ml, y se diluyeron hasta 10⁶ células/ml. Se añadieron 20 µg de cada plásmido purificado (1 mg/ml) a 760 µl de OptiPRO (Invitrogen n.º de cat. 12309-019). Se añadieron 80 µl de PEI 1 mg/ml a 720 µl de OptiPRO. Ambas disoluciones de OptiPRO se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió la disolución de ADN/OptiPRO a la disolución de PEI/OptiPRO y se incubó durante 10 minutos más a temperatura ambiente y después se añadió gota a gota a 40 ml del cultivo de HEK293 a 10⁶ células/ml. El sobrenadante se recogió 6-8 días después de la transfección. Los anticuerpos se purificaron mediante una cromatografía de proteína A (Pierce n.º de cat. 22811) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Proteínas modificadas: Los inventores tienden a emplear el término “proteína” para indicar polímeros de aminoácidos más largos o más grandes y moléculas proteicas de múltiples cadenas o de múltiples unidades, y a emplear el término “polipéptido” para indicar secuencias más cortas o una cadena de restos aminoácidos dentro de una molécula más grande (por ejemplo, dentro de una proteína de fusión) o complejo. Sin embargo, ambos términos pretenden describir una entidad de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos, independientemente de la modificación postraducciona (por ejemplo, amidación, fosforilación o glicosilación). Las subunidades pueden estar unidas mediante enlaces peptídicos u otros enlaces, tales como, por ejemplo, enlaces éster o éter. El término “aminoácido” y la expresión “resto aminoácido” se refieren a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que pueden isómeros ópticos de la forma D o L.

Inmunoglobulinas: El primer y/o el segundo polipéptido dentro de las proteínas modificadas puede ser, o puede ser parte de una inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden asumir diversas configuraciones e incluyen proteínas que consisten en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Se puede emplear el término “inmunoglobulina” como sinónimo de “anticuerpo.”

Una inmunoglobulina puede ser un tetrámero (por ejemplo, un anticuerpo que tenga dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) o una inmunoglobulina monocaténaria, y cualquiera de los polipéptidos en el tetrámero o el único polipéptido del anticuerpo monocaténario puede utilizarse como el primer y/o el segundo polipéptido de las proteínas modificadas de la presente. Por consiguiente, el primer y/o el segundo polipéptido puede ser una de las dos cadenas pesadas o regiones variables de cadena pesada, o una de las dos cadenas ligeras o regiones variables de cadena ligera. Las regiones de VHC y de VLC también pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR), intercaladas entre las regiones de marco más conservadas (FR). La extensión de las FR y las CDR ha sido definida (véase, Kabat, E. A., *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication n.º 91-3242, 1991; y Chothia, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917, 1987).

La cadena V_H o V_L de una inmunoglobulina también puede incluir toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera. Por ejemplo, los presentes primer y segundo polipéptido pueden estar dentro de un tetrámero de inmunoglobulina de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en los que las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina están interconectadas, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada incluye tres dominios: CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera está formada por un dominio: CL. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Los polipéptidos pueden ser los presentes en inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como sus subtipos (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄)), y las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser del tipo kappa o lambda. Los genes de inmunoglobulina humana reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa (IgA₁ e IgA₂), gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, épsilon, y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulinas.

Los polipéptidos dentro de las proteínas modificadas de la presente invención pueden incluir CDR procedentes de una fuente humana o no humana. El marco de la inmunoglobulina puede ser un marco humano, humanizado o no humano (por ejemplo, un marco murino modificado para disminuir la antigenicidad en seres humanos), o un marco sintético (por ejemplo, una secuencia consenso). Las inmunoglobulinas humanizadas son inmunoglobulinas en las que los restos del marco se corresponden con secuencias de la línea germinal humana, y las CDR se producen por recombinación V(D)J y mutaciones somáticas. Sin embargo, las inmunoglobulinas humanizadas también pueden comprender restos aminoácidos no codificados en las secuencias de ácidos nucleicos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *ex vivo*). Se ha demostrado que la mutación somática *in vivo* de genes variables humanos produce una mutación en los restos del marco (véase *Nat. Immunol.*, 2:537, 2001). Este anticuerpo se denomina "humano" por su fuente, a pesar de las mutaciones del marco. Los dominios variables de anticuerpos de ratón también contienen mutaciones somáticas en los restos del marco (véase *Sem. Immunol.*, 8:159, 1996). Por consiguiente, los ratones transgénicos que contiene el locus de Ig humano producen inmunoglobulinas que se denominan habitualmente "totalmente humanas," aunque posean un promedio de 4,5 mutaciones del marco (*Nature Genet.*, 15:146-156, 1997). Por tanto, el uso aceptado indica que un gen de dominio variable de anticuerpo basado en una secuencia de la línea germinal, pero que posee mutaciones del marco introducidas, por ejemplo, mediante un proceso mutacional somático *in vivo*, se denomina "humano." Tal como se indicó anteriormente, las presentes proteínas modificadas incluyen las que se unen específicamente a una diana celular y a un receptor de Fc activador, incluso si estas proteínas incluyen mutaciones (por ejemplo, mutaciones dentro de la FR) y sus fragmentos u otros variantes (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios que incluyen la VLC y la VHC de un anticuerpo humano multimérico).

La expresión "porción de unión al antígeno" de una inmunoglobulina o anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo," o "porción"), tal como se emplea en la presente, se refiere a una porción de una inmunoglobulina que se une específicamente a una diana celular. Una porción de unión al antígeno de una inmunoglobulina es, por tanto, una molécula en la que una o más cadenas de inmunoglobulina no son de longitud completa, pero que se une específicamente a una diana celular. Los ejemplos de fragmentos o porciones de unión al antígeno que pueden emplearse en las presentes proteínas incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VLC, VHC, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos a través de un enlace disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VHC y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VLC y VHC de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento de dAb (Ward *et al.*, *Nature*, 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio VHC; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada que tiene un marco suficiente para unirse específicamente, por ejemplo, a una porción de unión al antígeno de una región variable. Una porción de unión al antígeno de una región variable de cadena ligera y una porción de unión al antígeno de una región variable de cadena pesada, por ejemplo, los dos dominios del fragmento Fv, VLC y VHC, pueden unirse, empleando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite que pueda producirse una única cadena de proteína en la que las regiones VLC y VHC se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, *Science*, 242:423-426, 1988; y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, 1988).

Estas porciones de anticuerpos se obtienen empleando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y las porciones se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Un fragmento Fab puede surgir de la ruptura de un anticuerpo tetrámero con papaína; los fragmentos Fab' y F(ab')₂ pueden generarse mediante ruptura con pepsina.

En resumen, en las proteínas modificadas pueden incorporarse inmunoglobulinas monocatenarias, e inmunoglobulinas quiméricas, humanizadas o injertadas con CDR, que incluyen las que presentan polipéptidos derivados de diferentes especies.

Las diversas porciones de estas inmunoglobulinas pueden unirse de modo químico a través de técnicas convencionales, o pueden prepararse como polipéptidos contiguos empleando técnicas de modificación genética. Por ejemplo, pueden expresarse ácidos nucleicos que codifiquen una cadena humanizada para que produzcan un polipéptido contiguo. Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente de EEUU n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, patente europea n.º 0.125.023 B1; Boss *et al.*, patente de EEUU n.º 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger *et al.*, documento WO 86/01533; Neuberger *et al.*, patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, patente de EEUU n.º 5.225.539; y Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1. Véase también, Newman *et al.*, *BioTechnology*, 10:1455-1460, 1992, con respecto a anticuerpos injertados con CDR; y Ladner *et al.*, patente de EEUU n.º 4.946.778; y Bird *et al.*, *Science*, 242:423-426, 1988, con respecto a anticuerpos monocatenarios.

En la presente también se describen secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que codifican cualquiera de los polipéptidos dentro de las proteínas modificadas de la presente, así como los métodos para fabricar las proteínas modificadas. Por ejemplo, pueden construirse regiones variables empleando métodos de mutagénesis de PCR para alterar secuencias de ADN que codifican una cadena de inmunoglobulina, por ejemplo, utilizando métodos empleados para generar inmunoglobulinas humanizadas (véase, por ejemplo, Kanunan *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:5404, 1989; Sato *et al.*, *Cancer Research*, 53: 851-856, 1993; Daugherty *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 19(9):2471-2476, 1991; y Lewis y Crowe, *Gene*, 101: 297-302, 1991). Empleando estos u otros métodos adecuados también pueden producirse con facilidad variantes. En un aspecto descrito en la presente, las regiones variables clonadas

pueden mutagenizarse y seleccionarse las secuencias que codifican los variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, a partir de un banco de fagos; véase, por ejemplo, Krebber *et al.*, patente de EEUU n.º 5.514.548; Hoogenboom *et al.*, documento WO 93/06213, publicado el 1 de abril, 1993)).

Otros métodos adecuados para producir o aislar inmunoglobulinas que reconocen específicamente una diana celular incluyen, por ejemplo, métodos que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-2555, 1993; Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258, 1993; Lonberg *et al.*, patente de EEUU n.º 5.545.806; Surani *et al.*, patente de EEUU n.º 5.545.807).

Las afinidades de unión de una proteína modificada de la presente invención (por ejemplo, una inmunoglobulina, una proteína similar a una inmunoglobulina, o cualquier otro tipo de entidad de unión descrita en la presente como útil en las proteínas modificadas) pueden ser determinadas con facilidad por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.*, 51:660-672, 1949).

Las proteínas modificadas pueden unirse a un quelato de metal con una afinidad, por ejemplo, de 10^{-4} M o menor, 10^{-7} M o menor, 10^{-9} M o menor, o con una afinidad subnanomolar (0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 nM o incluso menor). En un aspecto descrito en la presente, las proteínas modificadas tienen una afinidad por un quelato de metal (es decir, un resto que comprende DOTA, o un variante activo de DOTA, y un ion metálico quelado) que es mayor que la afinidad con la que la inmunoglobulina (un scFv) representada por SEQ ID NO:1 se une al quelato de metal. Las afinidades de las proteínas modificadas y/o el scFv de SEQ ID NO:1 pueden ser determinadas mediante cualquier método conocido en la técnica para medir la afinidad (por ejemplo, citometría de flujo) y, cuando se están comparando las afinidades de dos proteínas, las respectivas afinidades pueden determinarse bajo las mismas condiciones o bajo condiciones comparables (por ejemplo, a la misma temperatura (por ejemplo, 25°C o 37°C)). Véase, por ejemplo, el artículo de Gai y Wittrup (*Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17:467-473, 2007), en particular la figura 3, que compara las constantes de disociación determinadas mediante presentación sobre la superficie de levaduras y otros métodos, que incluyen las afinidades medidas en un sistema Biacore™. Para las proteínas modificadas de la invención, la afinidad (por ejemplo, la afinidad por un quelato de metal) está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 pM, por ejemplo, de aproximadamente 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM, 500 pM, 400 pM, 350 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM, 150 pM, 100 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10, pM, 8 pM, 5 pM, 2,5 pM, 2 pM, o 1 pM. De modo más específico, la afinidad puede ser de aproximadamente 8,2 pM.

Tal como se ha indicado, cuando las proteínas modificadas de la presente se derivan de SEQ ID NO:1, o incluyen una secuencia derivada de SEQ ID NO:1 (es decir, cuando las proteínas modificadas son o incluyen una secuencia que muestra un alto grado de identidad con SEQ ID NO:1 (por ejemplo, al menos 70% de identidad)), la proteína puede ser invariable en uno o más restos de contacto, y variable (por ejemplo, por la inclusión de una mutación de sustitución) en uno o más de los restos dentro de la segunda o tercera cubierta. Estas porciones se indican a continuación, con respecto a SEQ ID NO:1 y con el sistema de numeración de Kabat. La correspondiente posición en la secuencia y el resto en esa posición pueden mostrarse entre paréntesis.

Restos de contacto (<5 Angstroms)

Cadena ligera: L32 (es la posición 34; Y), L34 (36; N), L50 (52; G), L51 (53; N), L91 (93; W), L96 (98; W).

Cadena pesada: H35 (35; H), H50 (50; V), H52 (52; W), H53 (53; S), H95 (98; R), H96 (99; G), H97 (100; S), H98 (101; Y), H100A (104; N).

Restos de la 2ª cubierta (<5 Angstroms de los restos de contacto)

Cadena ligera: L28 (es 30; T), L29 (es 31; T), L30 (es 32; S), L31 (es 33; N), L33 (es 35; A), L35 (es 37; W), L36 (es 38; V), L48 (es 50; I), L49 (es 51; G), L52 (es 54; N), L53 (es 55; N), L87 (es 89; F), L88 (es 90; C), L89 (es 91; A), L90 (es 92; L), L92 (es 94; Y), L93 (es 95; S), L94 (es 96; N), L95 (es 97; H), L97 (es 99; V), L98 (es 100; F).

Cadena pesada: H29 (es 29; L), H30 (es 30; T), H31 (es 31; D), H32 (es 32; Y), H33 (es 33; G), H34 (es 34; V), H36 (es 36; W), H37 (es 37; V), H47 (es 47; W), H48 (es 48; L), H49 (es 49; G), H51 (es 51; I), H54 (es 54; G), H55 (es 55; G), H56 (es 56; G), H57 (es 57; T), H58 (es 58; A), H60 (es 60; T), H69 (es 69; I), H71 (es 71; K), H73 (es 73; N), H91 (es 94; Y), H92 (es 95; C), H93 (es 96; A), H94 (es 97; R), H99 (es 102; P), H100 (es 103; Y), H100B (es 105; Y), H100C (es 106; F), H101 (es 107; D).

Restos de la 3ª cubierta (<5 Angstroms de los restos de la 2ª cubierta)

Cadena ligera: L1, L2, L3, L4, L6, L21, L22, L23, L24, L25, L26, L27, L27B, L27C, L37, L38, L42, L44, L45, L46, L47, L54, L55, L56, L62, L63, L64, L65, L66, L71, L72, L73, L85, L86, L99, L100, L101.

Cadena pesada: H2, H4, H6, H20, H21, H22, H24, H26, H27, H28, H38, H39, H44, H45, H46, H59, H61, H63, H64, H67, H68, H70, H72, H74, H75, H76, H77, H78, H79, H80, H89, H90, H102, H103, H104, H105, H106, H107.

Las proteínas modificadas (por ejemplo, inmunoglobulinas, moléculas similares a inmunoglobulinas, y otras

proteínas de andamiaje) pueden modificarse para reducir o abolir la glicosilación. Una proteína (por ejemplo, una inmunoglobulina) que carece de glicosilación puede ser una inmunoglobulina que no esté glicosilada en absoluto; que no esté totalmente glicosilada; o que esté atípicamente glicosilada (es decir, el patrón de glicosilación para el mutante se diferencia del patrón de glicosilación de la correspondiente inmunoglobulina de tipo salvaje). Los polipéptidos de IgG pueden incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, o 3 o más) mutaciones que atenúan la glicosilación, es decir, mutaciones que produzcan un dominio CH2 de IgG que carece de glicosilación o que no está totalmente glicosilado o que está atípicamente glicosilado. Las mutaciones pueden estar en el sitio de glicosilación N-enlazado, o adyacentes a este, por ejemplo, dentro del bucle C'/E del dominio CH2. Las mutaciones en las posiciones 297, 298 y 299 de la IgG1 humana son dos ejemplos de dichas mutaciones. Las IgG mutantes también pueden incluir mutaciones en el dominio CH2 fuera del bucle C'/E, por ejemplo, en la posición 290, por ejemplo, K290N, K290E, o en la posición 326, por ejemplo, K326E.

En un aspecto, se describe un anticuerpo biespecífico que incluye una primera secuencia de aminoácidos que se une específicamente a una molécula diana, y una segunda secuencia de aminoácidos que se une específicamente a un quelato de metal que comprende DOTA, o uno de sus variantes activos (el quelato que porta un ion metálico, tal como un radionúclido). La primera secuencia de aminoácidos puede incluir una cadena pesada variable y/o una cadena ligera variable de una inmunoglobulina, y puede tener la estructura de una IgG tetrámera convencional. La segunda secuencia de aminoácidos puede ser o incluir un scFv. El scFv puede ser al menos o aproximadamente 70% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%) idéntico a SEQ ID NO:1, excluyendo el conector en los restos 120-134. El scFv dentro del anticuerpo biespecífico puede unirse específicamente a un quelato de metal que comprende DOTA con una Kd de aproximadamente 1 pM-1 nM. Al igual que en otros aspectos descritos en la presente, la molécula diana puede ser un antígeno del cáncer o un antígeno expresado por un virus, una célula bacteriana o un parásito. Los ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos biespecíficos también se describen en la presente, así como los vectores de expresión que incluyen secuencias que los codifican, y las células hospedantes que los contienen. Los anticuerpos biespecíficos pueden emplearse en los métodos de tratamiento descritos en la presente, en los métodos de purificación descritos en la presente, y en métodos para la fabricación de un medicamento (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa).

Proteínas de andamiaje: Como alternativa o además de las inmunoglobulinas, las proteínas modificadas de la presente invención pueden incluir proteínas de andamiaje. Estas proteínas son proteínas que comparten ciertas características estructurales con las inmunoglobulinas, por ejemplo, una estructura secundaria de lámina β . Los ejemplos de proteínas de andamiaje útiles incluyen las siguientes.

Dominios de fibronectina: Las proteínas modificadas pueden incluir un dominio de fibronectina de tipo III (Fn3) (por ejemplo, el décimo dominio de tipo III de Fn3 humano). El Fn3 es un pequeño sándwich β estable (aproximadamente 10 kDa), con un plegamiento similar a las inmunoglobulinas; tres bucles expuestos denominados BC, DE, y FG son estructuralmente análogos a las regiones determinantes de la complementariedad de anticuerpos (CDR). Los ejemplos de secuencias de fibronectina humana incluyen NP.002017.1 G1:16933542; el décimo dominio de tipo III incluye una región que se extiende desde los aminoácidos 1447 a aproximadamente 1550.

Los polipéptidos de Fn3, los monocuerpos de polipéptidos de Fn3, y los métodos para fabricar estas composiciones se describen en la patente de EEUU n.º 5.153.661. Los polipéptidos de la patente de EEUU n.º 5.153.661 pueden utilizarse en las proteínas modificadas de la presente o modificarse para alterar su especificidad de unión y emplearse en las proteínas modificadas de la presente. En la patente de EEUU n.º 7.115.396 también se describen proteínas que, en general, emplean un andamiaje derivado de Fn3, y pueden utilizarse para fabricar el primer y/o el segundo polipéptido dentro de los polipéptidos modificados de la presente.

Otras construcciones que se basan en el dominio de tipo III de fibronectina incluyen, por ejemplo, iMab o "monocuerpos" descritos, por ejemplo, en Koide y Koide (Methods in Molecular Biology, vol. 352: *Protein Engineering Protocols*, (2007), p. 95-109), y las adnectinas o trinectinas, que se seleccionan para que incluyan dos, tres o cuatro bucles que conectan las hebras en un extremo del sándwich beta, similar a las CDR de un anticuerpo.

Otros miembros de esta clase incluyen: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos humanos (CTLA-4) que comprende bucles similares a CDR similares a anticuerpos que permiten la sustitución de bucles; neocarzinostatina, un cromoproteína de unión a enediina aislada a partir de *Streptomyces carzinostaticus* que consiste en siete hebras β en dos láminas que forman un sándwich β , una topología similar al plegamiento de las inmunoglobulinas; el módulo de unión a carbohidratos 4-2, derivado de la xilanas Xyn10A de *Rhodothermus marinus*, que tiene una estructura de sándwich β formada por 11 hebras y que no contiene enlaces disulfuro; tendamistato, un inhibidor de la α -amilasa de 74 restos procedente de *Streptomyces tendae*, que incluye un bucle 1 de unión a α -amilasa que permite la aleatorización; y el barril β de la proteína fluorescente verde (GFP).

Andamiajes que no son de inmunoglobulinas: También pueden emplearse andamiajes que no son de inmunoglobulinas en las proteínas modificadas de la invención. Los ejemplos de andamiajes útiles que pueden modificarse para que se unan selectivamente a una diana celular o a un receptor de Fc activador incluyen las siguientes clases generales de polipéptidos.

Andamiajes que muestran una región de bucle hipervariable contigua: Las lipocalinas son polipéptidos de 160 a 180

restos implicados en el almacenamiento o el transporte de compuestos orgánicos hidrófobos y/o químicamente sensibles. Consisten en un β barril central de ocho hebras β antiparalelas, que mantienen un conjunto de cuatro bucles hipervariables que forman el sitio de unión al ligando. Los cuatro bucles hipervariables conectan las hebras β en una forma apareada en el extremo abierto de este motivo de plegamiento central. La posición de los aminoácidos mutantes depende de la naturaleza de la diana. Generalmente, cuando se emplea una lipocalina, esta puede incluir una o más mutaciones en la cavidad, los bucles, o ambos. Los ejemplos de miembros de la familia de la lipocalina incluyen la apolipoproteína D (ApoD) y la proteína de unión a ácidos grasos de corazón bovina (FABP).

Bucles de un solo péptido presentados sobre una proteína portadora: Los inhibidores de serina proteasas de tipo Kunitz son un grupo de pequeños inhibidores de proteasas irregulares con pocas estructuras secundarias que exponen un tramo de péptido más o menos largo con secuencia variable. Los ejemplos de inhibidores de serina proteasas de tipo Kunitz incluyen el inhibidor de tripsina de páncreas de vaca, el inhibidor de la coagulación D1 asociado con la lipoproteína humana, el inhibidor de inter- α tripsina humana, el inhibidor de tripsina secretora pancreática humana (PSTI), el inhibidor del precursor de la proteína β amiloide del Alzheimer (APPI), el inhibidor de tripsina derivado de la sanguijuela (LTDI), el inhibidor de tripsina de mostaza II (MTI II) y el inhibidor de proteasas periplásmico de *E. coli* ecotina.

Las tiorredoxinas son enzimas pequeñas, muy solubles y estructuralmente robustas implicadas en el equilibrio de tiol/disulfuro citosólico de *E. coli*. La secuencia corta del sitio activo de Cys-Gly-Pro-Cys forma un bucle accesible al disolvente y unido por un fuerte puente disulfuro en estado oxidado y permite la inserción de tramos peptídicos largos. Se han seleccionado aptámeros de péptidos de los correspondientes bancos de bucles aleatorios.

La "familia de la knotina" comprende proteínas pequeñas de 25 a 35 restos, algunas de las cuales actúan como inhibidores de proteasas. Incluyen enlaces disulfuro conservados, que conducen a la topología de nudos ("knotted") característica, y bucles de péptidos variables intercalados. Generalmente contienen una pequeña lámina β antiparalela tricatenaria y un motivo de nudo de cisteína que surge de tres puentes disulfuro entrelazados. Los andamiajes de knotina también se conocen como miniproteínas o microcuerpos. Los ejemplos de knotinas útiles incluyen el inhibidor de tripsina del pepinillo del diablo *Ecballium elaterium* (EETI-II), el dominio de unión a celulosa C-terminal (CBD) de la celobiohidrolasa I del hongo *Trichoderma reesei*.

Otros ejemplos útiles de proteínas de andamiaje de esta clase incluyen la defensina A de insecto, que forma una α -hélice y dos cadenas β , tiene dos regiones de bucle con tolerancia para las sustituciones, y está estabilizada por dos puentes disulfuro; el dominio PDZ, un módulo de reconocimiento de proteínas implicado en redes de señalización, que contiene tres α -hélices y cinco cadenas β ; las toxinas de escorpión, por ejemplo, la caribdotoxina de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, que incluye un motivo de 37 restos que consiste en una lámina β tricatenaria antiparalela, una α -hélice corta y tres puentes disulfuro estabilizantes; la proteína con dedo del homeodominio de plantas (PHD), una pequeña proteína con un núcleo bien estructurado que contiene dos iones de cinc, no contiene puentes disulfuro y presenta dos bucles variables y flexibles que parecen tolerantes a la mutagénesis, la expansión y el injerto de bucles; y β -lactamasa de TEM-1, una proteína más grande (263 restos) que tiene un esqueleto de proteína que consiste en numerosas α -hélices y láminas β , y un puente disulfuro.

Interfases que se apoyan en estructuras secundarias; marcos de α -hélice y láminas β : El dominio Z, uno de los cinco dominios de haces de tres α -hélices de la región de unión a Fc de inmunoglobulina de la proteína A estafilocócica, es muy soluble, proteolítica y térmicamente estable, y no contiene enlaces disulfuro. Trece restos de la superficie implicados en la unión a Fc se han aleatorizado para generar los llamados aficuerpos; la afinidad y la avidez de los aficuerpos ha sido aumentada mediante reordenación de α -hélices y multimerización.

Los dominios repetidos de ankirina consisten en unidades estructurales repetidas de 33 restos que comprende una vuelta β , seguida de dos α -hélices antiparalelas y un bucle que enlaza con la vuelta de la siguiente repetición. Pueden emplearse proteínas de repetición de ankirina (DARPin) con hasta cuatro repeticiones entre las repeticiones de cierre de cadena N- y C-terminales para generar un polipéptido que se une selectivamente a un FcR activador. Pueden introducirse mutaciones en una serie de regiones, por ejemplo, la vuelta β , una α -hélice, y la región de bucle, que representan la superficie de unión bajo condiciones naturales.

Otras proteínas que se encuentran dentro de esta clase incluyen la secuencia repetida consenso de proteínas de repetición ricas en leucina (familia de inhibidores de ribonucleasas de mamífero), y las afilinas, unas proteínas modificadas que comprenden dos andamiajes de proteínas diferentes: γ -cristalina humana, una proteína duradera de la lente ocular, y la ubiquitina humana, una pequeña proteína que normalmente está implicada en la degradación de proteínas intracelulares. En esta clase también se incluyen las proteínas de inmunidad, ejemplificadas por el andamiaje formado por α -hélices de la proteína de la inmunidad E7 colicina de *E. coli* (ImmE7), una proteína de 87 restos que no contiene cisteínas y se pliega en una topología de haces de cuatro hélices (α -hélices I-IV). A las α -hélices I y III les siguen dos bucles; el citocromo b562, una proteína de haces de cuatro hélices con dos bucles que conectan el marco de α -hélices; el péptido α 2p8, un péptido de 38 aminoácidos que comprende una horquilla de α -hélice que se deriva de las dos hélices N-terminales de la proteína p8MTCP1 humana (una pequeña proteína de 8 kDa codificada por el oncogén humano MTCP1).

Estructuras de dominios oligoméricos: Esta clase de proteínas incluyen proteínas de múltiples dominios modificadas

que forman complejos de estructura oligomérica e interacciones múltiples. Un ejemplo de esta clase son los avimeros, también conocidos como maxicuerpos, proteínas de múltiples dominios artificiales derivadas de los dominios A humanos, puesto que aparecen en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). El andamiaje comprende 35 aminoácidos, de los cuales las dos terceras partes pueden ser variables, y la confirmación se determina mediante tres enlaces disulfuro y un ion calcio complejado. Otro ejemplo de esta clase son las trinetinas, proteínas homotriméricas que incluyen un dominio de lectina de tipo C (CTLD) y un módulo de trimerización helicoidal. Los CTLD comparten un núcleo estructural conservado, que soporta un bucle que forma el sitio de unión a azúcar.

Dianas

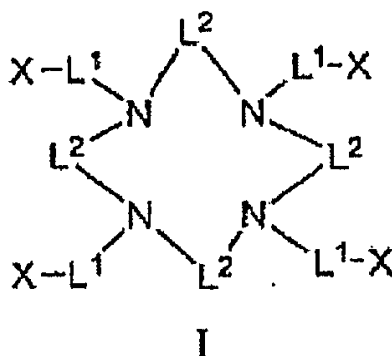
Las proteínas modificadas descritas en la presente son útiles para técnicas de clasificación y/o purificación y como proteínas terapéuticas. Las proteínas pueden unirse específicamente a dianas celulares implicadas en una amplia gama de enfermedades o trastornos (por ejemplo, cáncer). Por ejemplo, las proteínas pueden unirse a proteínas de la superficie celular y otros tipos de antígenos y, en virtud de su unión a la superficie celular, también pueden unirse a una célula *per se*. La diana puede ser una proteína u otra molécula expresada por un virus, o puede ser una diana celular. Por ejemplo, la diana puede ser una proteína u otro tipo de molécula expresada por una célula que esté proliferando de modo indeseable (por ejemplo, una célula cancerosa en un paciente) o por una célula bacteriana o por una célula dentro de un parásito. Cuando la diana es expresada por las células del propio paciente puede ser un "antígeno del cáncer" o un "antígeno asociado a tumor" (TAA), que incluyen antígenos basados en polipéptidos, carbohidratos o lípidos. Preferiblemente, el antígeno del cáncer o TAA se diferencia cualitativamente de cualquier homólogo expresado en células normales (es decir, en células no afectadas por el cáncer y que no están proliferando o que proliferan de modo normal).

Los ejemplos de cánceres que pueden ser tratados con las proteínas modificadas incluyen, sin limitación, cánceres hematológicos, tales como leucemias y linfomas (por ejemplo, linfoma de Burkitt, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, y leucemia de células T aguda), tumores neurológicos, tales como tumores cerebrales, astrocitomas o glioblastomas, melanomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales, tales como cáncer de estómago, colon o colorrectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, tumores genitourinarios, tales como cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer vulvar, cáncer de vejiga, cáncer testicular, cáncer de próstata, o cáncer de pene, tumores óseos, y tumores vasculares. Los ejemplos de TAA específicos incluyen, sin limitación, antígeno A33, HER-2/neu, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, MUC-1, N-acetilglucosaminiltransferasa, p15, gp75, beta-catenina, ErbB2, o antígeno del cáncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionario (CEA), RAGE, MART (antígeno del melanoma), MUC (mucina) (por ejemplo, MUC-1, MUC-2, etc.), tirosinasa, Pmel 17 (gp100), secuencia V del intrón GnT-V (secuencia V del intrón de N-acetilglucosaminiltransferasa), psm de cáncer de próstata, PRAME (antígeno del melanoma), β -catenina, EBNA (antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr) 1-6, p53, proteína de resistencia pulmonar (LRP) Bc1-2, antígeno específico de la próstata (PSA), y Ki-67. La "primera" secuencia de aminoácidos, tal como se describe en la presente, puede ser una secuencia que se une específicamente a cualquiera de estas moléculas.

La diana también puede ser una molécula (por ejemplo, un antígeno de proteína) expresada por un virus, una bacteria o un parásito. Cada uno de estos patógenos puede provocar una enfermedad y, en algunos casos, la enfermedad puede ser cáncer. Por ejemplo, el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C están asociados con cáncer hepatocelular; el papilomavirus humano (en particular ciertos tipos que expresan el antígeno E6 o E7) está asociado con el cáncer cervical, vaginal, vulvar, profaríngeo, anal, y de pene; el virus del herpes simplex está asociado con el cáncer cervical; el virus de Epstein-Barr está asociado con el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin y no hodgkiniano, y cánceres nasofaríngeos; el virus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV1) está asociado con la leucemia de células T aguda; la bacteria *Helicobacter pylori* está asociada con el cáncer de estómago; el parásito esquistosoma (*Schistosoma hematobium*) está asociado con el cáncer de vejiga; y la duela hepática (*Opisthorchis viverrini*) está asociada con colangiocarcinomas. Los antígenos expresados por estos patógenos pueden ser localizados por la primera secuencia de aminoácidos de las proteínas modificadas de la presente, y la segunda secuencia de aminoácidos posteriormente une un complejo de radiometal-quelato de DOTA dirigido a destruir la célula diana.

Quelatos de metal

Las proteínas modificadas de la invención se unen a quelatos de metal que incluyen DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,N',N'',N'''-tetraacético), o un variante activo de DOTA, y un ion metálico (que incluye radionúclidos). El DOTA es un agente quelante macrocíclico que forma complejos estables con metales que son fundamentalmente irreversibles bajo condiciones fisiológicas. El DOTA tiene un peso molecular de 405 Daltons, difunde con mucha rapidez y muestra una rápida eliminación renal. Se muestran ejemplos de DOTA y variantes de DOTA activos en la FIG. 2. Un variante de DOTA que tiene una estructura que se diferencia hasta cierto punto de la estructura de DOTA y que conserva la capacidad para actuar (por ejemplo, conserva la actividad suficiente para ser empleado para uno o más fines descritos en la presente) es un variante activo de DOTA. Estos variantes activos incluyen compuestos de fórmula I:



o su sal farmacéuticamente aceptable; en la que:

cada X se selecciona independientemente de carboxi, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^d$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{OR}^d)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{OH}$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHR}^d$, $-\text{OC}(=\text{S})\text{NHR}^d$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NR}^e\text{R}^f$, $-\text{NHC}(=\text{S})\text{NR}^e\text{R}^f$, $-\text{NR}^e\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^f$, y $-\text{NR}^e\text{C}(=\text{S})\text{NHR}^f$;

- 5 cada L^1 es, independientemente, alquilenilo C_{1-6} , alquenileno C_{1-6} , o alquinileno C_{1-6} , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 grupos seleccionados independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , alquiltio C_{1-4} , alquilsulfinilo C_{1-4} , alquilsulfonilo C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , dialquilamino C_{1-4} , (alquil C_{1-4})carbonilo, carboxi, (alcoxi C_{1-4})carbonilo, (alquil C_{1-4})carbonilamino, (dialquil C_{1-4})carbonilamino, (alcoxi C_{1-4})carbonilamino, (alcoxi C_{1-4})carbonil-(alquil C_{1-4})amino, carbamilo, (alquil C_{1-4})carbamilo, y (dialquil C_{1-4})-(alquil C_{1-4})carbamilo;

cada L^2 es independientemente un alquilenilo de cadena lineal C_{2-4} , que está opcionalmente sustituido con un grupo R^1 seleccionado independientemente y que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos seleccionados independientemente de alquilo C_{1-4} y haloalquilo C_{1-4} ;

- 15 cada R^1 se selecciona independientemente de H, $-\text{D}^1-\text{D}^2-\text{D}^3$, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , haloalcoxi C_{1-6} , alquiltio C_{1-6} , alquilsulfinilo C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} , amino, alquilamino C_{1-6} , dialquilamino C_{1-6} , (alquil C_{1-4})carbonilo, carboxi, (alcoxi C_{1-6})carbonilo, (alquil C_{1-6})carbonilamino, (dialquil C_{1-6})carbonilamino, (alcoxi C_{1-6})carbonilamino, (alcoxi C_{1-6})carbonil-(alquil C_{1-6})amino, carbamilo, (alquil C_{1-6})carbamilo, y (dialquil C_{1-6})carbamilo;

- 20 cada D^1 se selecciona independientemente de (arilo C_{6-10})-alquilo C_{1-4} , (heteroarilo C_{1-9})-alquilo C_{1-4} , (cicloalquil C_{3-10})-alquilo C_{1-4} , (heterocicloalquil C_{2-9})-alquilo C_{1-4} , alquilenilo C_{1-8} , alquenileno C_{1-8} , y alquinileno C_{1-8} ; en la que dichos alquilenilo C_{1-8} , alquenileno C_{1-8} , y alquinileno C_{1-8} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^4 seleccionados independientemente; y en la que dichos (arilo C_{6-10})-alquilo C_{1-4} , (heteroarilo C_{1-9})-alquilo C_{1-4} , (cicloalquil C_{3-10})-alquilo C_{1-4} , y (heterocicloalquil C_{2-9})-alquilo C_{1-4} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^5 seleccionados independientemente;

- 25 cada D^2 está independientemente ausente o es alquilenilo de cadena lineal C_{1-20} , en la que de 1 a 6 grupos metileno no adyacentes de dicho alquilenilo de cadena lineal C_{1-20} están cada uno opcionalmente reemplazados por un resto $-\text{D}^4$ seleccionado independientemente, con la condición de que al menos una unidad de metileno en dicho alquilenilo de cadena lineal C_{1-20} no está opcionalmente reemplazado por un resto $-\text{D}^4$; en la que dicho alquilenilo de cadena lineal C_{1-20} está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , dialquilamino C_{1-4} , (alquil C_{1-4})carbonilo, carboxi, (alcoxi C_{1-4})carbonilo, (alquil C_{1-4})carbonilamino, (dialquil C_{1-4})carbonilamino, (alcoxi C_{1-4})carbonilamino, (alcoxi C_{1-4})carbonil-(alquil C_{1-4})amino, carbamilo, (alquil C_{1-4})carbamilo, y (dialquil C_{1-4})carbamilo;

- 35 cada D^3 se selecciona independientemente de H, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , alquinilo C_{2-6} , cicloalquilo C_{3-14} , (cicloalquil C_{3-14})-alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-14} , (heterocicloalquil C_{2-14})-alquilo C_{1-4} , arilo C_{6-14} , (aril C_{6-14})-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-13} , (heteroaril C_{1-13})-alquilo C_{1-4} ; en la que dichos alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , alquenilo C_{2-6} , y alquinilo C_{2-6} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^6 seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C_{3-14} , (cicloalquil C_{3-14})-alquilo C_{1-4} , heterocicloalquilo C_{2-14} , (heterocicloalquil C_{2-14})-alquilo C_{1-4} , arilo C_{6-14} , (aril C_{6-14})-alquilo C_{1-4} , heteroarilo C_{1-13} , (heteroaril C_{1-13})-alquilo C_{1-4} están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^7 seleccionados independientemente;

cada D^4 se selecciona independientemente de $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^a\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^c-$, $-\text{NR}^b\text{C}(=\text{S})\text{NR}^c-$, $-\text{S}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NR}^a-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^a-$, $-\text{OC}(=\text{S})\text{NR}^a-$, $-\text{NR}^b\text{S}(=\text{O})\text{NR}^c-$, y $-\text{NR}^b\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^c-$;

- 45 cada R^4 y R^6 se selecciona independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , alquiltio C_{1-4} , alquilsulfinilo C_{1-4} , alquilsulfonilo C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , dialquilamino C_{1-4} , (alquil C_{1-4})carbonilo, carboxi, (alcoxi C_{1-4})carbonilo, (alquil C_{1-4})carbonilamino, (dialquil C_{1-4})carbonilamino, (alcoxi C_{1-4})carbonilamino,

(alcoxi C₁₋₄)carbonil-(alquil C₁₋₄)amino, carbamilo, (alquil C₁₋₄)carbamilo, y (dialquil C₁₋₄)carbamilo;

cada R⁵ se selecciona independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C₁₋₄, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, alcoxi C₁₋₄, haloalcoxi C₁₋₄, alquiltio C₁₋₄, alquilsulfino C₁₋₄, alquilsulfonilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, dialquilamino C₁₋₄, (alquil C₁₋₄)carbonilo, carboxi, (alcoxi C₁₋₄)carbonilo, (alquil C₁₋₄)carbonilamino, (dialquil C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxi C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxi C₁₋₄)carbonil-(alquil C₁₋₄)amino, carbamilo, (alquil C₁₋₄)carbamilo, y (dialquil C₁₋₄)carbamilo;

cada R⁷ se selecciona independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄, -OR^o, -SR^o, -S(=O)R^p, -S(=O)₂R^p, -S(=O)NR^sR^t, -C(=O)R^p, -C(=O)OR^p, -C(=O)NR^sR^t, -OC(=O)R^p, -OC(=O)NR^sR^t, -NR^sR^t, -NR^qC(=O)R^f, -NR^qC(=O)OR^f, -NR^qC(=O)NR^f, -NR^qS(=O)₂R^f, y -NR^pS(=O)₂NR^sR^t; en la que dichos alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R' seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, (heteroaril C₁₋₄)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R" seleccionados independientemente;

cada R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, y R^f se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄; en la que dichos alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, y alquinilo C₂₋₆ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^w seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^x seleccionados independientemente;

cada R^o, R^p, R^q, R^r, R^s, y R^t están cada uno seleccionado independientemente de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄; en la que dichos alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, y alquinilo C₂₋₆ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^y seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^z seleccionados independientemente;

cada R', R^w y R^y se selecciona independientemente de hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi C₁₋₄, haloalcoxi C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, y dialquilamino C₁₋₄;

y cada R", R^x y R^z se selecciona independientemente de hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, haloalcoxi C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, y dialquilamino C₁₋₄;

con la condición de la que no se exceda la valencia de cada átomo en los restos opcionalmente sustituidos.

El DOTA está disponible en el mercado y ha demostrado ser seguro en seres humanos cuando está quelado con el gadolinio y se emplea en concentraciones milimolares como agente de contraste de MRI (Bourrinet *et al.*, *Invest. Radiol.*, 42:63-77, 2007).

El DOTA y los variantes de DOTA se quelan con una amplia gama de metales, que incluyen metales paramagnéticos y radionúclidos. El metal dentro del quelato puede ser cualquiera de una amplia gama de metales, dependiendo de la forma en que se empleará la proteína modificada. Los ejemplos de metales incluyen itrio, indio, galio, gadolinio, europio, terbio, lutecio, cobre, bismuto, actinio y todos los metales lantánidos. Cuando el metal es un radionúclido, este puede ser un emisor β, por ejemplo, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, o ⁶⁷Cu, un α emisor, por ejemplo, ²¹³Bi, ²¹¹At, ²²⁵Ac, o un emisor de electrones de baja energía, concretamente un emisión Auger, por ejemplo, ¹²⁵I, ¹¹¹In o ⁶⁷Ga. En general, los radionúclidos útiles incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹⁷⁷Lu, o ¹⁵⁷Gd, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁹Zr, ⁴⁷Sc, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Tb, ¹⁶⁶Tb, ¹⁶⁶HO, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²⁵Ac y ²²⁷Ac.

Los quelatos de metal de la invención pueden conjugarse con uno o más restos adicionales, por ejemplo, una molécula pequeña, un polipéptido o un carbohidrato. El enlace puede realizarse, por ejemplo, a través de uno de los carbonos en el esqueleto del anillo macrocíclico. Una molécula pequeña puede ser, por ejemplo, un tinte, tal como Alexa 647 o Alexa 488; biotina o un resto de biotina. Un polipéptido puede ser un oligopéptido, por ejemplo, un péptido o polipéptido terapéutico, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un scFv que se une a una diana celular. Los ejemplos de carbohidratos incluyen dextrano, polímeros o copolímeros lineales o ramificados (por ejemplo, polialquileño, polietilenlisina, polimetacrilato, poliaminoácidos, poli- u oligosacáridos, dendrímeros).

Ácidos nucleicos

La expresión "ácido nucleico" y el término "polinucleótido" pueden emplearse de modo intercambiable en la presente, y se refieren ambos a ARN y ADN, que incluye ADNc, ADN genómico, ADN sintético, y ADN (o ARN) que contenga

análogos de ácidos nucleicos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional. Un ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario (es decir, una hebra sentido o una hebra antisentido). Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen genes, fragmentos de genes, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm) y sus porciones, ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNmc, micro-ARN, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácidos nucleicos, así como análogos de ácidos nucleicos. En el contexto de la presente invención, los ácidos nucleicos pueden codificar una proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o uno de sus fragmentos, o una proteína de fusión o uno de sus fragmentos.

Un ácido nucleico “aislado” puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN natural, o uno de sus fragmentos, con la condición de que al menos una de las secuencias de ácidos nucleicos que normalmente se encuentra inmediatamente flanqueante con dicha molécula de ADN en el genoma natural se haya eliminado o esté ausente. Así, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, una molécula de ADN que existe como una molécula separada, independiente de otras secuencias (por ejemplo, un ácido nucleico sintetizado de modo químico, o un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) o un tratamiento con endonucleasas de restricción). Un ácido nucleico aislado también se refiere a una molécula de ADN que está incorporada en un vector, un plásmido de replicación autónoma, un virus, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado, tal como una molécula de ADN que sea parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión. Un ácido nucleico que existe entre muchos (por ejemplo, docenas, o cientos a millones) otros ácidos nucleicos dentro, por ejemplo, de bancos de ADNc o bancos genómicos, o cortes de gel que contengan una digestión de restricción de ADN genómico, no es un ácido nucleico aislado.

Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas pueden producirse mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden emplearse las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener un ácido nucleico aislado que contenga una secuencia de nucleótidos descrita en la presente, que incluye secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido descrito en la presente (es decir, una proteína modificada). La PCR puede utilizarse para amplificar secuencias específicas a partir de ADN, y también de ARN, que incluyen secuencias procedentes del ADN genómico total o del ARN celular total. Se describen diversos métodos de PCR por ejemplo en *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Dieffenbach y Dveksler, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. En general, se emplea la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá de esta para diseñar cebadores oligonucleotídicos que son idénticos o similares en secuencia a las hebras opuestas del molde que se va a amplificar. También están disponibles diversas estrategias de PCR por las cuales pueden introducirse modificaciones de la secuencia de nucleótidos específicas de sitio en un molde de ácido nucleico (como puede ser el caso, por ejemplo, cuando se está fabricando una proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante, o uno de sus fragmentos, o una proteína de fusión o uno de sus fragmentos). También pueden sintetizarse de modo químico ácidos nucleicos aislados, como una única molécula de ácido nucleico (por ejemplo, empleando la síntesis de ADN automática en la dirección 3' a 5' utilizando la tecnología de fosforamídita) o como una serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse una o más parejas de oligonucleótidos largos (por ejemplo, >50-100 nucleótidos) que contengan la secuencia deseada, y cada pareja contiene un segmento corto de complementariedad (por ejemplo, aproximadamente 15 nucleótidos) de modo que se forma un dúplex cuando la pareja de oligonucleótidos se asocia. Se emplea la ADN polimerasa para extender los oligonucleótidos, lo cual produce una única molécula de ácido nucleico bicatenaria por pareja de oligonucleótidos, que después puede asociarse en un vector. Los ácidos nucleicos aislados de la invención también pueden obtenerse mediante mutagénesis, por ejemplo, de una porción natural de un ADN que codifica una proteína modificada.

Se pueden describir dos ácidos nucleicos, o los polipéptidos que codifican, como que tienen cierto grado de identidad entre sí. Por ejemplo, se puede describir una proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante, o uno de sus fragmentos, o una proteína de fusión o uno de sus fragmentos, y uno de sus variantes biológicamente activos, como que muestra un cierto grado de identidad. Los alineamientos pueden ensamblarse localizando secuencias cortas en la proteína modificada, por ejemplo, secuencias de anticuerpos en el sitio de Protein Information Research (PIR) (<http://pir-dot-georgetown-dot-edu>), seguido de un análisis con el algoritmo de “secuencias cortas casi idénticas” Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en el sitio web de NCBI (<http://www-dot-ncbi-dot-nlm-dot-nih-dot-gov/blast>).

Tal como se emplea en la presente, la expresión “porcentaje de identidad de secuencia” se refiere al grado de identidad entre cualquier secuencia interrogante concreta y una secuencia caso. Por ejemplo, una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), natural o no natural, puede ser la secuencia interrogante, y una segunda proteína, tal como una proteína mutante (por ejemplo, un anticuerpo natural en el que se han introducido una o más mutaciones) puede ser la secuencia caso. Por ejemplo, una secuencia conocida, tal como SEQ ID NO:1, puede actuar como la secuencia interrogante, y una nueva proteína, tal como una proteína descrita en la presente, puede ser la secuencia caso.

Para determinar la identidad de secuencia, una secuencia de aminoácidos o un ácido nucleico interrogante puede alinearse con una o más secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos caso, respectivamente, empleando el programa informático ClustalW (versión 1.83, parámetros por defecto), que permite realizar alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos o proteínas a lo largo de su longitud completa (alineamiento global). Véase Chenna

et al., Nucleic Acids Res., 31:3497-3500, 2003.

ClustalW calcula el mejor apareamiento entre una secuencia interrogante y una o más secuencias caso, y las alinea para poder determinar las identidades, las similitudes y las diferencias. Pueden insertarse huecos de uno o más restos en una secuencia interrogante, una secuencia caso, o ambas, para maximizar los alineamientos de secuencia. Para un alineamiento de un par de secuencias de ácidos nucleicos se emplean los siguientes parámetros por defecto: tamaño de la palabra: 2; tamaño de la ventana: 4; método de puntuación: porcentaje; número de diagonales superiores: 4; y penalización de hueco: 5. Para múltiples alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos se emplean los siguientes parámetros: penalización de apertura de hueco: 10,0; penalización de extensión de hueco: 5,0; y transiciones de peso: sí. Para un alineamiento rápido de un par de secuencias de proteína se emplean los siguientes parámetros: tamaño de la palabra: 1; tamaño de la ventana: 5; método de puntuación: porcentaje; número de diagonales superiores: 5; penalización de hueco: 3. Para múltiples alineamientos de secuencias de proteínas se emplean los siguientes parámetros: matriz de peso: Blossum; penalización de apertura de hueco: 10,0; penalización de extensión de hueco: 0,05; huecos hidrófilos: encendido; restos hidrófilos: Gly, Pro, Ser, Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, y Lys; penalizaciones de hueco específicas de resto: encendido. La salida es un alineamiento de secuencias que refleja la relación entre las secuencias. ClustalW puede ejecutarse, por ejemplo, en el sitio de the Baylor College of Medicine Search Launcher (searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html) y en el sitio de the European Bioinformatics Institute en la red mundial ("World Wide Web", ebi.ac.uk/clustalw).

Para determinar el porcentaje de identidad entre una secuencia interrogante y una secuencia caso, ClustalW divide el número de identidad en el mejor alineamiento entre el número de restos comparado (se excluyen las posiciones de hueco), y multiplica el resultado por 100. La salida es el porcentaje de identidad de la secuencia caso con respecto a la secuencia interrogante. Se hace notar que el valor del porcentaje de identidad puede redondearse hasta la decena más cercana. Por ejemplo, 78,11, 78,12, 78,13, y 78,14 se redondean a 78,1, mientras que 78,15, 78,16, 78,17, 78,18, y 78,19 se redondean a 78,2.

Los ácidos nucleicos y los polipéptidos descritos en la presente pueden denominarse "exógenos". El término "exógeno" indica que el ácido nucleico o el polipéptido es parte, o está codificado por una construcción de ácido nucleico recombinante, o no está en su entorno natural. Por ejemplo, un ácido nucleico exógeno puede ser una secuencia procedente de una especie introducida en otra especie, es decir, un ácido nucleico heterólogo. Generalmente, este ácido nucleico exógeno se introduce en la otra especie a través de una construcción de ácido nucleico recombinante. Un ácido nucleico exógeno también puede ser una secuencia que es nativa a un organismo y que se ha reintroducido en células de ese organismo. Un ácido nucleico exógeno que incluye una secuencia nativa a menudo puede distinguirse de la secuencia natural por la presencia de secuencias no naturales unidas al ácido nucleico exógeno, por ejemplo, secuencias reguladoras no nativas que flanquean una secuencia nativa en una construcción de ácido nucleico recombinante. Además, los ácidos nucleicos exógenos transformados de modo estable generalmente se integran en posiciones distintas de la posición en la que se encuentra la secuencia nativa.

En la presente también se proporcionan construcciones recombinantes y pueden emplearse para transformar células para que expresen una proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o uno de sus fragmentos, o una proteína de fusión o uno de sus fragmentos. Una construcción de ácido nucleico recombinante comprende un ácido nucleico que codifica una proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o uno de sus fragmentos, o una proteína de fusión o uno de sus fragmentos, tal como se describe en la presente, unido operablemente con una región reguladora adecuada para expresar la proteína modificada, por ejemplo, un anticuerpo, un anticuerpo mutante o uno de sus fragmentos, o una proteína de fusión o uno de sus fragmentos en la célula. Así, un ácido nucleico puede comprender una secuencia codificadora que codifica cualquiera de los anticuerpos, según se indica en SEQ ID NO:1-17 (por ejemplo, en la FIG. 3). En algunos casos, una construcción de ácido nucleico recombinante puede incluir un ácido nucleico que comprende una secuencia codificadora, un gen, o un fragmento de una secuencia codificadora o gen en una orientación antisentido, de modo que se transcribe la hebra antisentido de ARN. Se apreciará que un conjunto de ácidos nucleicos pueden codificar un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos concreta. La degeneración del código genético es muy conocida en la técnica. Para muchos aminoácidos, existe más de un triplete de nucleótidos que actúa como codón para el aminoácido. Por ejemplo, los codones en la secuencia codificadora para un fragmento concreto de un anticuerpo, un anticuerpo mutante, o uno de sus fragmentos, o una proteína de fusión o uno de sus fragmentos, pueden modificarse de modo que se obtenga la expresión óptima en un organismo concreto, empleando las tablas de sesgo de codones apropiadas para ese organismo.

También se proporcionan vectores que contiene ácidos nucleicos, tales como los descritos en la presente. Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, un fago o un cósmido, en el que puede insertarse otro segmento de ADN para provocar la replicación del segmento insertado. En general, un vector es capaz de replicación cuando está asociado con los elementos de control apropiados. Los esqueletos de vectores adecuados incluyen, por ejemplo, los que se emplean habitualmente en la técnica, tales como plásmidos, virus, cromosomas artificiales, BAC, YAC, o PAC. El término "vector" incluye los vectores de clonación y de expresión, así como vectores víricos y vectores de integración. Un "vector de expresión" es un vector que incluye una región reguladora. Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitación, plásmidos y vectores víricos derivados, por ejemplo, de bacteriófagos, baculovirus, y retrovirus. Numerosos vectores y sistemas de expresión están disponibles en el mercado en empresas tales como Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA), e Invitrogen/Life

Technologies (Carlsbad, CA).

Los vectores proporcionados en la presente pueden incluir, por ejemplo, orígenes de la replicación, regiones de unión de andamiajes (SAR) y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable a una célula hospedante. Por ejemplo, un marcador puede conferir resistencia a un biocida, tal como resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, G418, bleomicina, o higromicina). Tal como se indicó anteriormente, un vector de expresión puede incluir una secuencia de marcador diseñada para facilitar la manipulación o la detección (por ejemplo, la purificación o la localización) del polipéptido expresado. Las secuencias de marcadores, tales como las secuencias de marcadores de proteína fluorescente verde (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina, o Flag™ (Kodak, New Haven, CT) generalmente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Estos marcadores pueden insertarse en cualquier lugar dentro del polipéptido, incluyendo el carboxilo- o amino-terminal.

El vector también puede incluir una región reguladora. La expresión “región reguladora” se refiere a secuencias de nucleótidos que influyen en el inicio y la tasa de transcripción o traducción y en la estabilidad y/o movilidad de un producto de la transcripción o de la traducción. Las regiones reguladoras incluyen, sin limitación, secuencias de promotores, secuencias de potenciadores, elementos de respuesta, sitios de reconocimiento de proteínas, elementos inducibles, secuencias de unión a proteínas, regiones sin traducir 5' y 3' (UTR), sitio de inicio de la traducción, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación e intrones.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “unido operablemente” se refiere a la colocación de una región reguladora y una secuencia que se va a transcribir en un ácido nucleico de modo que influya en la transcripción o la traducción de dicha secuencia. Por ejemplo, para que una secuencia codificadora esté bajo el control de un promotor, el sitio de inicio de la traducción del marco de lectura traduccional del polipéptido se coloca generalmente entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos cadena abajo del promotor. Sin embargo, un promotor puede colocarse en un punto tan lejano como a aproximadamente 5.000 nucleótidos cadena arriba del sitio de inicio de la traducción o a aproximadamente 2.000 nucleótidos cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor generalmente comprende al menos un promotor básico (basal). Un promotor también puede incluir al menos un elemento de control, tal como una secuencia de potenciador, un elemento cadena arriba o una región de activación cadena arriba (UAR). La elección de los promotores que se van a incluir depende de varios factores, que incluyen, pero no se limitan a la eficacia, la capacidad de selección, la capacidad de inducción, el nivel de expresión deseado y la expresión preferente en células o tejidos. Los expertos en la técnica habitualmente modulan la expresión de una secuencia codificadora seleccionando y colocando de forma apropiada los promotores y otras regiones reguladoras con relación a la secuencia codificadora.

En la presente también se proporcionan células hospedantes. Una célula hospedante puede ser, por ejemplo, un procariota, por ejemplo, una bacteria tal como *E. coli*, o un eucariota, por ejemplo, una célula de levadura, de insecto o de mamífero.

Métodos de uso: Las proteínas modificadas descritas en la presente son útiles, en general y de forma variada, para generar respuestas inmunológicas, como vacunas profilácticas o productos terapéuticos que estimulan la respuesta inmunológica, y en programas de purificación. Un paciente se trata con eficacia cuando se produce un resultado clínicamente beneficioso. Esto puede significar, por ejemplo, la resolución completa de los síntomas de una enfermedad, una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, o el freno del avance de la enfermedad.

Los métodos descritos en la presente pueden aplicarse a una amplia gama de especies, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos u otro tipo de ganado, perros, gatos u otros mamíferos que se cuidan como mascotas, ratas, ratones u otros animales de laboratorio. Las proteínas modificadas descritas en la presente son útiles en regímenes y composiciones terapéuticas o para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos, tal como se describe en la presente (por ejemplo, un cáncer descrito en la presente o una enfermedad infecciosa).

Administración y formulación: Las proteínas modificadas descritas en la presente pueden administrarse directamente a un mamífero, al que también se le denomina “sujeto” o “paciente.” En general, las proteínas modificadas pueden suspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, disolución salina fisiológica o una disolución salina tamponada) para facilitar su administración (por ejemplo, mediante administración intravenosa). La encapsulación de los polipéptidos en un vehículo de administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de transporte. Una composición puede fabricarse combinando cualquiera de los péptidos proporcionados en la presente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estos vehículos pueden incluir, sin limitación, emulsiones, suspensiones y disoluciones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen aceite mineral, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. Los vehículos acuosos incluyen, sin limitación, agua, alcohol, disolución salina y disoluciones tamponadas. También pueden estar presentes conservantes, aromatizantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes (por ejemplo, galato de propilo), agentes quelantes, gases inertes y similares. Se apreciará que cualquier material descrito en la presente que se va a administrar a un mamífero puede contener uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Cualquier composición descrita en la presente puede administrarse a cualquier parte del cuerpo del receptor para el transporte posterior a una célula diana. Una composición puede administrarse, sin limitación, al cerebro, el fluido cerebroespinal, las articulaciones, la mucosa nasal, la sangre, los pulmones, los intestinos, los tejidos musculares, la piel o la cavidad peritoneal de un mamífero. En términos de vías de administración, una composición puede administrarse mediante inyección intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intramuscular, intrarrectal, intravaginal, intratecal, intratraqueal, intradérmica, o transdérmica, mediante administración oral o nasal, o mediante perfusión gradual a lo largo del tiempo. En otro ejemplo, puede administrarse una preparación en aerosol al receptor mediante inhalación.

La dosificación requerida dependerá de la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la enfermedad del paciente, el tamaño, el peso, la superficie específica, la edad y el sexo del paciente, otros fármacos que se estén administrando y el criterio de los médicos encargados. Las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-1.000 µg/kg. Se espera una amplia variación en la dosificación necesaria, en vista de la diversidad de dianas celulares y de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Pueden ajustarse variaciones en estos niveles de dosificación empleando rutinas empíricas convencionales para la optimización, tal como se entiende en la técnica. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (por ejemplo, en 2 o 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 o más veces). La encapsulación de las proteínas modificadas en un vehículo de administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de transporte.

La duración del tratamiento con cualquier composición proporcionada en la presente puede tener cualquier longitud de tiempo, desde un tiempo tan corto como un día hasta la vida completa del receptor (por ejemplo, muchos años). Por ejemplo, una proteína modificada puede administrarse una vez semanal (por ejemplo, durante 4 semanas a muchos meses o años); una vez mensual (por ejemplo, durante tres a doce meses o durante muchos años); o una vez anual durante un periodo de 5 años, diez años o más. También se hace notar que la frecuencia del tratamiento puede ser variable. Por ejemplo, las proteínas modificadas de la presente pueden administrarse una vez (o dos, tres veces, etc.) diaria, semanal, mensual, o anual.

Una cantidad eficaz de cualquier composición proporcionada en la presente puede administrarse a un individuo que necesite tratamiento. El término "eficaz", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier cantidad que induce una respuesta deseada sin inducir una toxicidad significativa en el paciente. Esta cantidad puede determinarse evaluando la respuesta de un paciente después de la administración de una cantidad conocida de una composición concreta. Además, puede determinarse el nivel de toxicidad, si existe, evaluando los síntomas clínicos de un paciente antes y después de administrar una cantidad conocida de una composición concreta. Se hace notar que la cantidad eficaz de una composición concreta administrada a un paciente puede ajustarse según un resultado deseado, así como según la respuesta del paciente y el nivel de toxicidad. La toxicidad significativa puede variar para cada paciente concreto y depende de múltiples factores que incluyen, sin limitación, el estado de enfermedad, la edad y la tolerancia a los efectos secundarios del paciente.

Puede utilizarse cualquier método conocido por los expertos en la técnica para determinar si se induce una respuesta concreta. Pueden emplearse métodos clínicos que puedan evaluar el grado de un estado de enfermedad concreto para determinar si se induce una respuesta. Los métodos concretos utilizados para evaluar una respuesta dependerán de la naturaleza del trastorno del paciente, de la edad y el sexo del paciente, de otros fármacos que se estén administrando y del criterio del médico encargado.

Como alternativa, un polinucleótido que contenga una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína modificada puede transportarse hasta una célula apropiada del animal. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de transporte de microcápsulas o micropartículas biodegradables poliméricas, con un tamaño adecuado para optimizar la fagocitosis por las células fagocíticas, tales como macrófagos. Por ejemplo, pueden emplearse micropartículas de PLGA (poli-láctida-co-glicólido) con un diámetro de aproximadamente 1-10 µm. El polinucleótido se encapsula en estas micropartículas, que son captadas por macrófagos y gradualmente se biodegradan dentro de la célula, liberando con ello el polinucleótido. Tras haber sido liberado, el ADN se expresa dentro de la célula. Un segundo tipo de micropartícula está prevista para no ser captada directamente por las células, sino para actuar principalmente como depósito de liberación lenta de un ácido nucleico que es captado por las células solo tras su liberación de las micropartículas por biodegradación. Por tanto, estas partículas poliméricas deben ser lo suficientemente grandes para impedir la fagocitosis (es decir, más grandes que 5 µm y preferiblemente más grandes que 20 µm).

Otra manera de lograr la captación del ácido nucleico es la utilización de liposomas preparados mediante métodos convencionales. Los vectores pueden incorporarse solos en estos vehículos de transporte o pueden incorporarse con anticuerpos específicos de tejido. Como alternativa, se puede preparar un conjugado molecular compuesto de un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina mediante fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor sobre las células diana. El transporte de "ADN desnudo" (es decir, sin un vehículo de transporte) hacia un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio de lograr la expresión *in vivo*.

En los polinucleótidos pertinentes (por ejemplo, vectores de expresión), la secuencia de ácido nucleico que codifica

la proteína modificada con un iniciador de metionina y, opcionalmente, una secuencia de transporte dirigido, se une operablemente a una combinación de promotor o potenciador-promotor. Los promotores y los potenciadores se han descrito anteriormente y muchos son muy conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos pueden administrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano u otro sujeto mamífero (por ejemplo, disolución salina fisiológica). Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del polinucleótido que es capaz de producir un resultado médicamente deseable (por ejemplo, una disminución en los síntomas motores clínicos) en un mamífero tratado. Tal como se conoce en la técnica médica, la dosificación para cualquier paciente concreto depende de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, la superficie específica del cuerpo, la edad, el compuesto concreto que se va a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando al mismo tiempo. Las dosificaciones variarán, pero una dosificación preferida para la administración del polinucleótido es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula polinucleotídica. Esta dosis puede administrarse repetidamente, según sea necesario. Las vías de administración pueden ser cualquiera de las listadas anteriormente.

Terapia de combinación: Las proteínas modificadas descritas en la presente también pueden administrarse con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico, o un producto quimioterapéutico del cáncer. No es necesario que la administración concurrente de dos o más agentes terapéuticos se realice al mismo tiempo o a través de la misma vía, con la condición de que exista un solapamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como la administración en diferentes días o semanas.

En algunos aspectos descritos en la presente, los métodos proporcionados contemplan la administración de combinaciones, o "cócteles," de diferentes proteínas modificadas. Estos cócteles pueden tener ciertas ventajas puesto que contienen polipéptidos que aprovechan diferentes funciones efectoras. Estas proteínas en combinación pueden mostrar efectos terapéuticos sinérgicos. Las proteínas modificadas útiles incluyen las que se dirigen al receptor de EGF (por ejemplo, Cetuximab (Erbix™)), las que se dirigen a VEGF (por ejemplo, Bevacizumab (Avastin™)) y las que se dirigen a Her-2 (por ejemplo, trastuzumab (Herceptin™)).

Un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o provoca la destrucción de células. El término permite incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o toxinas sintéticas o sus fragmentos. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe ni evita la función de células y/o no provoca la destrucción de células. Un agente no citotóxico puede incluir un agente que puede ser activado para que se convierta en citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir una esfera, un liposoma, una matriz o una partícula (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EEUU 2003/0028071 y 2003/0032995). Estos agentes pueden conjugarse, acoplarse, unirse o asociarse con un anticuerpo descrito en la presente.

En algunos aspectos descritos en la presente, se administran medicamentos del cáncer convencionales con las composiciones descritas en la presente. Los agentes adecuados incluyen los agentes que estimulan los daños en el ADN, por ejemplo, rupturas bicatenarias en el ADN celular, en las células del cáncer. Puede emplearse cualquier forma de agente causante de daños en el ADN conocido por los expertos en la técnica. Los daños en el ADN pueden producirse generalmente mediante terapia de radiación y/o quimioterapia. Los ejemplos de terapia de radiación incluyen, sin limitación, terapia de radiación externa y terapia de radiación interna (también denominada braquiterapia). Las fuentes de energía para la terapia de radiación externa incluyen rayos X, rayos gamma y haces de partículas; las fuentes de energía empleadas en la radiación interna incluyen yodo radiactivo (yodo 125 o yodo 131), y del estroncio 89 , o radioisótopos de fósforo, paladio, cesio, iridio, fosfato o cobalto. Los métodos para administrar la terapia de radiación son muy conocidos por los expertos en la técnica.

Tal como se ha indicado, las proteínas modificadas de la presente también pueden utilizarse en programas de clasificación y purificación, y los inventores esperan que dichos métodos sean ventajosos frente a los métodos disponibles en la actualidad, tales como los que se realizan empleando HPLC, puesto que una clasificación y purificación realizadas empleando las proteínas modificadas de la presente deberían ser más rápidas. Esto puede ser importante cuando se están purificando o aislando quelatos de metal que incluyan isótopos con semivida corta. Por consiguiente, las proteínas modificadas de la invención pueden unirse a un soporte sólido, tal como una esfera, una resina u otro material adecuado para su uso con una columna de purificación, y estas composiciones unidas a un sustrato están dentro del alcance de la presente invención. Para separar de forma satisfactoria restos radiomarcados (por ejemplo, un agente quimioterapéutico unido a un quelato de metal que comprende DOTA, o uno de sus variantes activos, y un ion metálico radiactivo) de los restos sin marcar, se utilizará una columna o un dispositivo similar al que se ha unido una proteína de unión a DOTA según se ha descrito en la presente. Después una mezcla (por ejemplo, una mezcla de reacción) que contiene restos radiomarcados y no radiomarcados se hace pasar sobre la columna (u otro dispositivo) a la cual está unida la proteína de unión a DOTA. La columna puede enjuagarse según sea necesarios, y los restos radiomarcados pueden eluirse mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, lavando con disoluciones de pH bajo).

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de modelización

Los modelos de PRIT desarrollados en la presente son extensiones de los sistemas de dos modelos desarrollados y descritos por Thurber y colaboradores (*J. Nucl. Med.*, 48:995-999, (2007)). El modelo de micrometástasis emplea la geometría esférica y supone un transporte solo por difusión. El modelo de tumor vascularizado emplea la geometría cilíndrica alrededor de capilares. Se realizaron simulaciones numéricas en MATLAB (The Math Works, Framingham, MA).

Las simulaciones de PRIT se realizaron para 1 gramo de tumor vascularizado y unas micrometástasis con un diámetro de 400 micrómetros, suponiendo un ser humano de 70 kg con 3,5 litros de volumen de sangre. El anticuerpo se administra como una dosis en embolada de 7 μmol en el momento cero. El hapteno se administra como una dosis en embolada de 350 nmol con una actividad inicial de 5 GBq a las 24 h. El modelo aplica una etapa de eliminación 2 h antes de la dosificación del hapteno, en la que 99,9% del bsAb (anticuerpo biespecífico) remanente se elimina de la sangre. Se calcula la concentración de hapteno no unido en la sangre como la concentración inicial de hapteno menos el hapteno que se une al anticuerpo residual en la sangre. El modelo supone un radionúclido 90Y que es 100% residualizante a lo largo del periodo de simulación de 13 días.

Tal como se indicó, se realizó una modelización matemática del efecto de la afinidad de unión a DOTA sobre la administración de radiación ionizante en PRIT. Se aplicaron dos modelos matemáticos que simulan una PRIT basándose en modelos previamente validados, uno que simula la distribución de anticuerpos en tumores vascularizados y el otro en micrometástasis (Thurber *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 48:995-999, 2007). Estos dos tipos de tumores fueron considerados por separado debido a los diferentes modos de transporte. Para las micrometástasis, el anticuerpo y el hapteno se difunden hacia el interior de la masa tumoral desde el fluido intersticial circundante. Aunque puede haber algún transporte desde el fluido intersticial circundante hacia los bordes de grandes tumores vascularizados, la mayoría del transporte del anticuerpo y del hapteno se produce a través de la vasculatura del tumor.

Los inventores extendieron ambos modelos para tomar en cuenta la cinética del hapteno, suponiendo un bsAb con un sitio de unión a hapteno y un sitio de unión a antígeno con especificidad para el antígeno carcinoembrionario (CEA), con un semitiempo de internalización de 15 h (Schmidt *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 12 de abril, 2008). Los inventores utilizaron una concentración sanguínea inicial de bsAb de 2 micromolar como variable de entrada. Los inventores esperan que esta concentración inicial sature fundamentalmente los sitios de unión al antígeno para tumores vascularizados a partir de los resultados de la modelización de los inventores y de los de Fenwick y colaboradores (Fenwick *et al.*, *Int. J. Cancer*, 44:1017-1027, 1989) que demuestran que son necesarias unas dosis de anticuerpo de varios cientos de microgramos o más para obtener la saturación en un modelo de xenoinjerto de ratón. La aplicación del modelo supone una dosificación de bsAb en el momento 0, seguido de una etapa de eliminación/bloqueo a las 22 h y la dosificación del hapteno a las 24 h, con una concentración sanguínea inicial del hapteno de 100 nanomolar. El modelo de los inventores predice que esta dosis de hapteno saturará los sitios de unión de bsAb prelocalizados en el tumor vascularizado. Nótese que las dosis de bsAb y hapteno son unas órdenes de magnitud mayores que las predichas para saturar las micrometástasis. El modelo supone un hombre de 70 kg y unos parámetros farmacocinéticos de 2 compartimentos para el anticuerpo y el hapteno.

Se ejecutaron las simulaciones del modelo de PRIT, variando la tasa de disociación del hapteno y manteniendo constante la tasa de asociación. Se consideró la concentración de hapteno en el tumor como una función del tiempo y la actividad acumulada total suponiendo un radionúclido 90Y con una semivida de 64 h. Se predijo la retención del hapteno en los tumores vasculares (FIG. 1A) y las micrometástasis (FIG. 1B) a través de un intervalo de K_D del hapteno de seis órdenes de magnitud. El modelo supone que los quelatos de DOTA están 100% residualizados después de la internalización; la internalización de los complejos de hapteno-anticuerpo-CEA produce la meseta observada en la FIG. 1 en tiempos largos. Se relajó esta suposición y se ejecutaron simulaciones con una constante de tasa no residualizante y se descubrió que la actividad acumulada total era constantemente menor para todas las afinidades, y la misma tendencia se conservó para afinidades distintas. También se observó el efecto de variar la tasa de asociación manteniendo una K_D constante, y no se descubrieron diferencias significativas en la retención del hapteno para unas tasas de asociación del hapteno típicas (5×10^5 - $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), lo cual demuestra que el parámetro importante es la K_D .

Para las condiciones de PRIT mencionadas anteriormente, se predice que una K_D del hapteno mayor que 100 pM permitirá una significativa retención del hapteno para tumores vascularizados y para micrometástasis.

Ejemplo 2: Complejos de DOTA

Se disolvió DOTA (Macrocyclics M-140) y DOTA-Bn (ácido S-2-(4-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecantetraacético; Macrocyclics B-200) en acetato de sodio 0,4 M, pH 5,2, para preparar disoluciones madre.

Se sintetizó DOTA-Bn-biotina disolviendo amina-PEG3-biotina (Pierce 21347) y p-SCN-Bn-DOTA (ácido S-2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecantetraacético; Macrocyclics B-205) en sulfóxido de dimetilo (DMSO)

con un exceso molar en 10 veces de trietilamina 30 (VWR #EM-TX 1200-5). La mezcla de reacción se agitó en vórtice a temperatura ambiente durante 3 horas, y después se purificó mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La purificación de HPLC se realizó en una columna de fase inversa C-18 (Agilent modelo 1100 HPLC, 1 x 25 cm, tampón A = ácido trifluoroacético al 0,05% (TFA), tampón B = TFA al 0,0425% en acetonitrilo al 80%, gradiente de B al 2-100% durante 98 minutos). La corriente se controló mediante la detección de la absorbancia a 280 nanómetros. Se confirmaron las fracciones que contenían DOTA-Bn-biotina empleando una espectrometría de masas de tiempo de vuelo-instrumento de desorción de láser asistido por matriz (MALDI-TOF) (Applied Biosystems modelo Voyager DE-STR). Se evaluó la pureza química mediante HPLC analítico (Agilent modelo 1100 HPLC, 2,1 x 150 mm, tampón A = TFA al 0,05%, tampón B = TFA al 0,0425% en acetonitrilo al 80%, gradiente de B al 2-100% durante 45 minutos). Se determinó la concentración de DOTA-Bn-biotina empleando un kit de cuantificación de biotina (Pierce 28005) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se sintetizó DOTA-alquil-biotina siguiendo el procedimiento de Takenouchi *et al.* (*J. Organic Chem.*, 58:1955-1958, 1993) comenzando con el compuesto H-Lys(Boc)-OMe (Bachem, E-1620). El H-Lys(Boc)-OMe se trató de modo discontinuo con bromoacetato de metilo y dietilentriamina para obtener 4-(3,12-dioxo-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-2-il)butilcarbamato de terc-butilo. Se empleó un complejo de borano-THF para reducir las amidas carboxílicas, seguido de la desprotección del Boc del ácido trifluoroacético para obtener 4-(1,4,7,10-tetraazaciclododecan-2-il)butan-1-amina. Este compuesto posteriormente se hizo reaccionar con biotina-xx, SSE (Invitrogen, B-6352) en DMSO con un exceso molar en 10 veces de trietilamina durante 3 horas agitando en vórtice a temperatura ambiente. En todas las etapas de síntesis, los compuestos se purificaron mediante HPLC y se confirmaron mediante espectrometría de masas con una espectrometría de masas-cromatografía líquida (LC/MS) de tiempo de vuelo-electronebulización (ES-TOF) de LCT Waters (Milford, MA) o mediante MALDI-TOF según se describió anteriormente.

Se prepararon los complejos de metal de cada derivado de DOTA (véase la FIG. 2 para las estructuras químicas) como sigue. Se obtuvieron el nitrato de itrio hexahidrato, el cloruro de lutecio(III) hexahidrato, el cloruro de indio(III), el nitrato de galio(III) hidrato, y el cloruro de gadolinio(III) hexahidrato en Sigma y se prepararon como disoluciones madre en acetato de sodio 0,4 M, pH 5,2. A una disolución 2 mM (para DOTA y DOTA-Bn) o 400 μ M (para DOTA-Bn-biotina) del agente quelante se añadió un exceso molar en 5 veces de la disolución madre del metal y se queló mediante una rotación durante la noche a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 7 con NaOH 10 M y el complejo se diluyó con disolución salina tamponada con fosfato con albúmina de suero bovina al 0,1% (PBSA) hasta una concentración final de 1 mM (para DOTA y DOTA-Bn) o 200 μ M (para DOTA-Bn-biotina). Para los quelatos de gadolinio se empleó un procedimiento de carga de metal idéntico, excepto que la reacción de complejación se realizó a 80°C durante 12 h en un termociclador. La complejación completa del quelante se confirmó mediante LC/MS empleando una columna de 75 μ m x 150 mm C18 (Magic C18 de Michrom Bioresources).

Ejemplo 3: Caracterización de la cinética

Mediciones de K_D para DOTA-Bn-biotina-metal: Se determinaron las constantes de disociación en equilibrio (K_D) para la unión de scFv presentados sobre la superficie de levadura a complejos de DOTA biotinilados a 37°C por triplicado, según se describe en Chao *et al.* (*Nat. Protoc.*, 1:755-768, 2006). Brevemente, se cultivaron levaduras que expresan un clon de scFv sobre su superficie, se lavaron con PBSA y se incubaron con diversas concentraciones de DOTA-Bn-biotina-metal durante un tiempo suficiente para permitir un aproximación de al menos 95% al equilibrio. En general se emplearon 5×10^5 células inducidas para cada punto de concentración. Cuando se ensayaron concentraciones de antígeno menores que 10 pM, la titulación se realizó con $2,5 \times 10^4$ células inducidas y $7,5 \times 10^5$ células no inducidas para asegurar un exceso de antígeno frente al scFv sin requerir unos volúmenes grandes poco prácticos. La adición de células no inducidas ayuda a la sedimentación durante la centrifugación (Hackel *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 381:1238-1252, 2008). Cuando se emplean concentraciones mayores que 100 nM se toma en cuenta la unión de antígenos no específica a la superficie de las levaduras. Las levaduras que expresan un scFv irrelevante sobre su superficie se trataron de la misma manera que las levaduras que presentan el scFv de interés, y se midió el promedio de fluorescencia de ficoeritreína total (MFU_{tot}) debida a la unión no específica mediante citometría de flujo y se promedió para tres duplicados. Este valor se restó del MFU_{tot} para la levadura de interés, y los datos se ajustaron mediante una regresión de mínimos cuadrados.

Mediciones de K_D para DOTA-metal y DOTA-Bn-metal: Para determinar la K_D para la unión de scFv a haptenos no biotinilados se modificó el anterior protocolo para lograr un ensayo basado en la competición como sigue. Después de determinar la K_D para la unión de scFv a DOTA-Bn-biotina-Y, se constituyó una titulación con DOTA-Bn-biotina-Y 100 pM, $2,5 \times 10^5$ células por tubo, y concentraciones variables del complejo no biotinilado. La incubación, la tinción y el análisis de citometría de flujo fueron los mismos que para el antígeno biotinilado. MFU_{tot}, como una función de la concentración del antígeno no biotinilado ([Ag]), una constante de normalización (MFU_{range}), el mínimo del promedio de la fluorescencia total (MFU_{min}), la K_D para DOTA-Bn-biotina-Y ($K_{D,biot}$), la concentración de DOTA-Bn-biotina-Y ([Ag_{biot}]), y la K_D para el antígeno de interés (K_D) siguen esta ecuación modificada:

$$MFU_{tot} = MFU_{min} + \frac{MFU_{range} \times [Ag_{biot}]}{K_{D,biot} + [Ag_{biot}] + \left(\frac{K_{D,biot}}{K_D} \right) [Ag]}$$

Los datos se ajustaron mediante regresión de mínimos cuadrados como antes, variando MFU_{min}, MFU_{range} y K_D.

Cinética de disociación: Para determinar la tasa de disociación, k_{off}, para los complejos de DOTA-Bn-biotina, se indujeron células y se lavaron como se indicó anteriormente, y 1 x 10⁷ células se incubaron en 1 ml de PBSA con DOTA-Bn-biotina-metal 1 nM durante 1 h para alcanzar la saturación. Después las levaduras se lavaron con 1 ml de PBSA, se resuspendieron en 1 ml de PBSA con antígeno no biotinilado 1 μM (en exceso) como competidor y se dividieron en partes alícuotas de 100 μl. Estas partes alícuotas se incubaron a 37°C durante diferentes longitudes de tiempo, después se lavaron con PBSA frío y se mantuvieron en hielo. Todas las muestras se tiñeron de modo simultáneo con estreptavidina-ficoeritrina durante 10-20 min y se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación mediante una regresión de mínimos cuadrados, variando MFU_{min}, MFU_{range} y k_{off}:

$$MFU_{tot} = MFU_{min} + MFU_{range} e^{-k_{off}t}$$

Para los antígeno no biotinilados el procedimiento fue idéntico, excepto que la saturación inicial se realizó con el antígeno no biotinilados y se empleó DOTA-Bn-biotina-metal como competidor. Los datos cumplen la expresión:

$$MFU_{tot} = MFU_{min} + MFU_{range} (1 - e^{-k_{off}t})$$

Ejemplo 4: Maduración por afinidad

El scFv 2D12.5 actuó como punto de partida y se sometió a nueve rondas de evolución dirigida mediante mutagénesis aleatoria y posterior selección para una mayor unión empleando la presentación sobre la superficie de levaduras, según describen Chao y colegas (*Nat. Protoc.*, 1:755-768, 2006) que se adaptó como sigue.

Preparación de los complejos de DOTA: Los quelatos de DOTA se incubaron con itrio, gadolinio, lutecio, galio e indio durante la noche para la formación de complejos con el metal. Los productos se analizaron mediante LC-MS para verificar que todo el quelato de DOTA había sido cargado con el metal. Todos los ejemplos muestran un pico o picos correspondientes a la masa esperada del complejo de metal con patrones de isótopos característicos. Las muestras no contenían DOTA no complejo detectable.

Mutagénesis: Para contrarrestar el sesgo mutacional de la PCR propensa a errores también se realizó una mutagénesis en cada ronda con el kit de mutagénesis Mutazyme (Stratagene) según las instrucciones del fabricante, y el ADN mutagenizado resultante se reunió con el obtenido mediante PCR propensa a errores. Todas las demás etapas se realizaron según métodos convencionales (véase Chao *et al.*).

Selección: Cada ronda de mutagénesis produjo un banco de tamaño 0,5-4 x 10⁷ y se clasificó 2-3 veces mediante citometría de flujo para ligantes mejorados. La diversidad calculada del banco se marcó al menos cinco veces para la clasificación celular. La tinción se realizó mediante incubación en equilibrio a una concentración de DOTA-Y biotinilado de aproximadamente 1/3 del promedio de K_D del banco previo (en las primeras rondas) o mediante saturación con el antígeno, seguido de disociación para 2-3 semitiempos de disociación (en las rondas posteriores), y el posterior marcaje con estreptavidina-ficoeritrina. Para marcar la expresión del scFv de longitud completa, las levaduras también se tiñeron con un anticuerpo primario anti-HA de ratón (clon 12CA5, Roche Applied Science) o un anti-cmyc de ratón (clon 9e10, Covance) y un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra Alexa-647 (Invitrogen). Se recogieron las levaduras que expresaban el mejor 0,01-0,1% de ligantes. Periódicamente se alternó el antígeno entre DOTA-Bn-biotina-Y y DOTA-alkil-biotina-Y.

Estabilización con disulfuro e inactivación de la glicosilación: Se retiró el sitio de glicosilación N-enlazado en la cadena pesada del scFv y se introdujo un enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera durante la séptima mutagénesis de la maduración por afinidad. Esto se logró introduciendo, mediante mutagénesis dirigida a sitio de PCR, las mutaciones N88E o N88D, Q111C, y L179C (la numeración se corresponde con la secuencia de scFv; FIG. 3C).

Selección de los clones: Los clones individuales se aislaron transformando *E. coli* XL-1 azul químicamente competente (Stratagene) con ADN plasmídico aislado del banco de levaduras (kit Zymoprep™ II, Zymo Research) y cultivando en placas de agar que contenían ampicilina. Se escogieron las colonias individuales y se cultivaron en medio líquido durante la noche, y el ADN plasmídico se aisló empleando el kit Qiagen Miniprep. El ADN plasmídico se secuenció y se volvió a transformar en levaduras con el kit de transformación EZ Yeast (Zymo Research). Se cultivaron los cultivos de levaduras clonales y se determinaron sus parámetros cinéticos.

Ejemplo 5: Análisis de los anticuerpos madurados por afinidad

Los inventores realizaron una maduración por afinidad del fragmento de anticuerpo 2D12.5 contra DOTA-Y biotinilado mediante evolución dirigida. Se sintetizó el gen que codifica la IgG de DOTA 2D12.5 en un formato de scFv (FIG. 3C) a partir de su secuencia publicada (Corneille *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 125:15039-15048, 2003). En total se realizaron nueve rondas de maduración por afinidad. Se marcaron las levaduras que expresan los variantes 2D12.5 con DOTA-Bn-biotina-Y o DOTA-alkyl-biotina-Y (FIG. 2), seguido de estreptavidina-ficoeritrina y se clasificaron mediante citometría de flujo para seleccionar los clones con mayor afinidad. El antígeno se cambió periódicamente para minimizar la selección de variantes con mutaciones que confieren una mejor unión a la región del conector. Durante la séptima mutagénesis, se introdujo un enlace disulfuro intramolecular entre las regiones variables pesada y ligera del scFv (Reiter *et al.*, *Nat. Biotechnol* 14:1239-1245, 1996) y se eliminó el sitio de glicosilación N-enlazado en la cadena pesada. Estas mutaciones adicionales pueden mejorar la estabilidad y dar como resultado un procesamiento corriente abajo más sencillo del scFv.

Las secuencias de aminoácidos para un panel de mutantes se muestran en la FIG. 6. Se determinaron las secuencias y las constantes cinéticas para varios clones de los bancos 8.2 (8 rondas de mutagénesis, seguidas de 2 clasificaciones) y 9.3 (9 rondas de mutagénesis y 3 clasificaciones). Todos los clones del banco 9.3 habían perdido el enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera y, por consiguiente, se desecharon. De los clones del banco 8.2, C8.2.5 mantuvo el enlace disulfuro y se unió con la mayor fuerza a DOTA-Bn-biotina-Y.

La secuencia del scFv C8.2.5 de alta afinidad se diferencia de 2D12.5ds (el scFv 2D12.5 original con la adición del enlace disulfuro intramolecular y el sitio de glicosilación eliminado) en 15 posiciones de aminoácidos. La distribución espacial en la estructura cristalina del 2D12.5 de tipo salvaje se muestra en las figuras FIGS. 3A y 3B. Solo una mutación, N53(L)H (la numeración se corresponde con el fragmento de unión al antígeno (Fab) 2D12.5 para el cual se determinó la estructura cristalina), se produjo dentro de 5 Angstroms del hapteno unido, lo cual indica que la mayoría de las mutaciones potencian la afinidad a través de sutiles perturbaciones estructurales muy alejadas de la interfase de unión.

Se caracterizaron las propiedades cinéticas de 2D12.5ds y C8.2.5, y se resumen en las tablas 1 y 2. La afinidad del scFv por DOTA-Bn-biotina-Y aumentó en tres órdenes de magnitud, desde nanomolar a picomolar de un solo dígito. El semitiempo de disociación para DOTA-Bn-biotina-Y aumentó desde 5,5 min para 2D12.5ds hasta justo más de 5 horas para C8.2.5 (tabla 2).

El clon de alta afinidad C8.2.5 se unió a DOTA-Bn-biotina-Y, DOTA-Bn-Y, y DOTA-Y con unas constantes de disociación en equilibrio de $8,2 \pm 1,9$ pM, $15,4 \pm 2,0$ pM, y 103 ± 35 pM, respectivamente, lo cual indica que existen algunas interacciones de unión entre el scFv y el anillo de benceno y la región del conector de biotina. Las diferencias de afinidad entre estos diversos quelatos de itrio se reflejan en sus semividas de disociación (tabla 2).

De forma notable, los complejos de DOTA con lutecio y gadolinio se unieron a C8.2.5 de forma similar a los del itrio (véase la tabla 1). El scFv de alta afinidad también se unió a los quelatos de indio y galio con afinidad nanomolar. Todos los quelatos de DOTA-metal se unieron a C8.2.5 con una afinidad de aproximadamente un orden de magnitud más débil que el respectivo quelato de metal de DOTA-Bn, lo cual proporciona más pruebas de las interacciones de unión entre el scFv y el anillo de benceno.

Tabla 1

Constantes de disociación en equilibrio para scFv presentados sobre la superficie de levaduras unidos a complejos de DOTA				
scFv	Hapteno	Metal	K_D^*	n
2D12.5ds	DOTA-Bn-biotina	Y	$3,7 \pm 3,6$ nM	3
C8.2.5	DOTA-Bn-biotina	Y	$8,2 \pm 1,9$ pM	3
		DOTA-Bn	$15,4 \pm 2,0$ pM	3
		Lu	$10,8 \pm 2,5$ pM	3
		Gd	$34,0 \pm 5,3$ pM	2
		In	$1,01 \pm 0,04$ nM	2
		Ga	52 ± 12 nM	2
	DOTA	Y	103 ± 35 pM	3
		Lu	390 ± 14 pM	2
		Gd	149 ± 6 pM	2

Constantes de disociación en equilibrio para scFv presentados sobre la superficie de levaduras unidos a complejos de DOTA				
scFv	Hapteno	Metal	K _D *	n
		In	23,7 ± 3,7 nM	2
		Ga	216 ± 26 nM	2

*K_D aparece como promedio ± SE.

Tabla 2

scFv	Hapteno	Metal	Semivida de disociación*
2D12.5ds	DOTA-Bn-biotina	Y	5,5 ± 1,3
C8.2.5	DOTA-Bn-biotina	Y	302 ± 13
	DOTA-Bn	Y	53,1 ± 2,3
	DOTA	Y	3,5 ± 0,7
		Lu	3,8 ± 0,4

*Calculado como $\ln(2)/K_{\text{off}}$ y presentado en minutos como promedio ± DE para n = 3 experimentos.

Ejemplo 6: Construcción de anticuerpos biespecíficos

El formato biespecífico se diseñó como una fusión de scFv con el C-terminal de la cadena ligera de una IgG. La cadena pesada es la misma que la de una IgG1 y se subclonó en el vector de expresión de mamíferos gWiz, adquirido en Aldevron (Fargo, ND). La cadena ligera se construye como conductor-FLAG-VL-C_K-(Gly₄Ser)₂-scFv-cmyc, en la que VL es el dominio variable ligero, C_K es el dominio constante de cadena ligera kappa, y FLAG y cmyc son marcadores de epitopo N- y C-terminales, respectivamente. Se clonó en un plásmido gWiz separado. Ambos plásmidos se coexpresaron de forma transitoria en células HEK293 (n.º de catálogo no. R790-07) adquiridas en Invitrogen (Carlsbad, Calif.). Las células HEK293 se cultivaron en matraces en una plataforma de agitación orbital que gira a 140 rpm a 37°C, 5% de CO₂, y se subcultivaron siguiendo los protocolos del fabricante. Se realizó una cotransfección con polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección. Brevemente, las células HEK293 se subcultivaron hasta una densidad celular de 0,5-0,07 x 10⁶ células/ml 24 h antes de la transfección. Inmediatamente antes de la transfección, la densidad celular se ajustó a 1 x 10⁶ células/ml. Se añadieron 500 µg de cada plásmido purificado (1 mg/ml) a 19 ml de OptiPRO (Invitrogen). Se disolvieron 2 ml de PEI 1 mg/ml, pH 7,0 (PM 25.000) adquirido en Polysciences (Warrington, PA) disuelto en agua, a 18 ml de OptiPRO. Ambas disoluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió la disolución de ADN/OptiPRO a la disolución de PEI/OptiPRO y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se añadió gota a gota a 1 l del cultivo de HEK293. El sobrenadante se recogió 6-8 días después de la transfección. Los anticuerpos se purificaron mediante una cromatografía de proteína A (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Ill.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se fabricaron construcciones específicas mediante PCR de extensión de solapamiento y mutagénesis QuikChange. El bsAb Sm3e/C825 se clonó y se produjo tal como se describió anteriormente empleando los dominios VH y VL del scFv de anti-CEA Sm3e madurado por afinidad (Graff *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 17:293-304, 2004) y el scFv C8.2.5 estabilizado con disulfuro. El bsAb Sm3e/4m5.3 sustituye a un scFv 4m5.3 que es un ligante de fluoresceína femtomolar (Boder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:10701-10705, 2000) estabilizado con disulfuro mediante la introducción de dos restos cisteína, S43C en el dominio VL, y Q105C en el dominio VH (Reiter *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 14:239-245, 1996). El bsAb A33/4m5.3 emplea los dominios VH y VL de un fragmento Fab humanizado de A33 (Rader *et al.*, *JBC*, 275:13668-13676, 2000) para los dominios de unión de IgG. Se produjeron los plásmidos Sm3e IgG y A33 IgG introduciendo dos codones de fin en la cadena ligera inmediatamente después de la secuencia C_K mediante PCR QuikChange. El C-terminal de la cadena ligera de la IgG A33 se extendió por medio de un péptido de 18 aminoácidos ((G₄S)₂LPETGGSG), para fabricar la construcción de A33 IgG + péptido. La construcción de A33 IgG + péptido se estabilizó con disulfuro mediante la introducción de dos parejas diferentes de restos cisteína, VL G100C y VH G44C (dsl), y VL V43C y VH Q105C (ds2) (Reiter *et al.*, 1996).

Ejemplo 7: Diseño del plásmido y expresión en células HEK293

Los inventores han diseñado un anticuerpo biespecífico como fusión C-terminal a la cadena ligera de una IgG (FIG. 8). La cadena pesada es idéntica a la de una IgG. La cadena ligera se construye extendiendo una cadena ligera de IgG con un conector C-terminal (Gly₄Ser)₂, seguido de un scFv. En este estudio, la cadena ligera se construye con un marcador FLAG N-terminal y un marcador cmyc C-terminal para fines de caracterización. El bsAb totalmente ensamblado contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y es tetravalente con dos dominios de unión de

IgG y dos dominios de unión de scFv.

Se sintetizó un bsAb con este formato que se une al antígeno carcinoembrionario (CEA) y a los complejos del quelato de metal, DOTA. El bsAb Sm3e/C825 se construyó a partir de una IgG Sm3e y un scFv de unión a DOTA, C8.2.5, clonando los dominios variables pesado y ligero del scFv Sm3e de afinidad picomolar (Graff *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 17:293-304, 2004) en un plásmido que contenía los dominios constantes pesados y el dominio constante de cadena ligera kappa de IgG1. El scFv C8.2.5 posteriormente se clonó en el plásmido de cadena ligera inmediatamente después del C-terminal del gen Ck. Los plásmidos de expresión de cadena pesada y ligera se cotransfectaron de forma transitoria en células de mamífero HEK293. El anticuerpo segregado se purificó a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante una cromatografía de proteína A. Los rendimientos de Sm3e IgG y Sm3e/C825 bsAb fueron de aproximadamente 5-7 mg/l.

Una electroforesis en gel de SDS-PAGE no reductora del bsAb purificado muestra una especie con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa. Bajo condiciones reductoras, el bsAb produce dos bandas, ambas alrededor de 50 kDa, puesto que la fusión de scFv aumenta el peso molecular de la cadena ligera hasta aproximadamente 50 kDa. Una cromatografía de exclusión molecular del bsAb purificado muestra un único pico dominante con una pequeña cantidad de especies de peso molecular mayor, similar al observado para la IgG recombinante y para la IgG purificada a partir de plasma humano.

Ejemplo 8: Transporte dirigido al tumor *in vivo*

En este punto se presenta un nuevo método en tres etapas para PRIT que emplea un anticuerpo biespecífico IgG-scFv, un agente de eliminación basado en dextrano, y DOTA radiomarcado, y el ensayo de un estudio demostrativo preliminar en un modelo de xenoinjerto de ratón. Además se emplea este sistema para analizar *in vivo* el efecto de la afinidad de molécula pequeña sobre la captación tumoral. Se evaluó la biodistribución y la captación tumoral en ratones con xenoinjertos de tumores CEA-positivos y CEA-negativos para ^{177}Lu -DOTA, ^{111}In -DOTA-Bn, y ^{111}In -DOTA después de una prelocalización con un bsAb anti-CEA. Se calcularon las dosis para riñón, hígado y médula ósea empleando la metodología de la dosis de radiación interna médica (MIRD). El método PRIT produjo una captación tumoral de ^{177}Lu -DOTA de aproximadamente 14% de ID/g a las 24 h y las 48 h, unas proporciones de tumor a riñón de aproximadamente 20 a las 24 h y las 48 h, y unas proporciones de tumor a sangre mayores que 300 a las 24 h y las 48 h. Una afinidad de aproximadamente 100 pM produjo un aumento 8 veces mayor en la captación tumoral a las 24 horas que una afinidad de aproximadamente 1 nM, y una captación 28 veces mayor que una afinidad de aproximadamente 10 nM.

Reactivos: El ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), el ácido S-2-(R-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecantetraacético (DOTA-Bn) y el ácido S-2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecantetraacético (DOTA-SCN) se adquirieron en Macrocyclics (Dallas, TX). Todos los demás productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) o Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA), a menos que se indique lo contrario.

Síntesis del agente de bloqueo basado en dextrano: Se hicieron reaccionar 5 mg (10 nmol) del aminodextrano de 500 kDa adquirido en Invitrogen (Carlsbad, CA), con 136 moles de amina por mol de dextrano, con 3,7 mg (5,3 μmol) de DOTA-SCN en 1 ml de DMSO con 1,9 μl (13,6 μmol) de TEA durante la noche a temperatura ambiente con una suave agitación en vórtice. La mezcla de reacción de dextrano se diluyó con 14 ml de acetato de sodio 0,4 M, pH 5,2, y se añadieron 53 μmol de nitrato de itrio. La mezcla se incubó durante la noche a 37°C, se dializó frente a agua y después se secó mediante una centrifugación al vacío. El compuesto de dextrano secado se resuspendió en PBS y se purificó mediante una cromatografía de exclusión molecular empleando una columna Superdex 75 10/300 GL. Las fracciones que contenían el compuesto de dextrano se reunieron, se dializaron contra agua dos veces, se secaron mediante una centrifugación al vacío, se resuspendieron en disolución salina y se filtraron a 0,2 μm . El dextrano-DOTA-Y final contenía aproximadamente 130 moléculas de DOTA, según se evaluó mediante un ensayo TNBSA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Ill.).

Radiomarcaje: Los compuestos de DOTA se disolvieron a 0,5 mM en acetato de amonio, pH 5,6. Se añadió $^{177}\text{LuCl}_3$ (PerkinElmer, Waltham, MA) o $^{111}\text{InCl}_3$ (Cardinal Health, Dublín, OH) 1-2 mCi al quelato de metal y se incubó durante 1-2 h a 85-95 °C. Los compuestos radiomarcados se purificaron mediante RP-HPLC (Humblet *et al.*, *Contrast Media Mol. Formación de imágenes*: 1:196-211, 2006; Misra *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 48:1379-1389, 2007) con detección gamma en una columna de 4,6 x 75 mm Symmetry C18 empleando un gradiente lineal de B del 0% al 40% B a lo largo de 15 minutos, con un caudal de 1 ml/min, siendo A = TEAA 10 mM y B = metanol. Los compuestos purificados se secaron al vacío, se resuspendieron en disolución salina y se esterilizaron mediante filtración.

Las proteínas de IgG y bsAb se conjugaron con p-SCN-Bn-DTPA (Macrocyclics) según se ha descrito (Cooper *et al.*, *Nat. Protoc.*, 1:314-317, 2006). La proteína marcada con DTPA concentrada se incubó con $^{111}\text{InCl}_3$ de aproximadamente 1 mCi durante 30 minutos a temperatura ambiente. La proteína se diluyó con 500 μl de disolución salina y se concentró hasta aproximadamente 50 μl empleando columnas giratorias de valor de corte de peso molecular 5000 Vivaspín (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Francia). La proteína marcada con ^{111}In se diluyó con 500 μl de disolución salina y se concentró dos veces más.

Se preparó ^{111}In -DOTA-dextrano sintetizando el dextrano-DOTA tal como se describió anteriormente, sin carga de itrio frío. El dextrano-DOTA se incubó con $^{111}\text{InCl}_3$ 1-2 mCi durante 1 h a 37°C, seguido de una concentración y una dilución con disolución salina, tal como se describió anteriormente.

Modelos animales: Todas las manipulaciones de los animales se realizaron según las directrices de BIDMC IACUC.

Los ratones NCRU-nu/nu macho se adquirieron en Taconic Farms (Germantown, N.Y.). Para la biodistribución y la captación tumoral se inyectó hapteno marcado con ^{177}Lu o ^{111}In 100-150 μCi por vía intravenosa a los ratones. Se recogió sangre de la vena de la cola empleando tubos microcapilares y se contó en un contador gamma de 10 detectores modelo 1470 Wallac Wizard (Perkin Elmer, Wellesley, MA). Los ratones recibieron la eutanasia mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital, seguido de dislocación cervical, un método coherente con las recomendaciones del Panel on Euthanasia of the American Veterinary Medical Association. Se retiraron los órganos y los tumores, se lavaron en PCS tres veces, se pesaron y se contaron como se describió anteriormente.

Dosimetría: Se calcularon las dosis de radiación absorbidas por los tejidos normales distintos a la médula roja, según el esquema de MIRD. Se calculó el porcentaje de actividad inyectada en el tumor, los riñones, el hígado, la sangre y el cuerpo entero a partir de las mediciones de actividad. Se supuso que la actividad en el momento 0 era de 4% ID/g en el riñón y el hígado, de 50% ID/g en la sangre, de 0% ID/g en el tumor y de 100% en el cuerpo entero. La actividad ajustada a la descomposición del isótopo se integró a lo largo del tiempo, con una suposición conservadora de que el porcentaje de ID en los órganos a las 48 h permanece constante después. Se emplearon los valores S para ^{90}Y y ^{177}Lu para calcular las estimaciones de la dosimetría en machos adultos de referencia (Stabin y Siegel, *Health Phys.*, 85:294-310, 2003). La dosis para la médula roja se calculó como se ha descrito (Wessels *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 45:1725-1733, 2004) a partir de las mediciones de actividad en sangre. Se empleó la actividad en el cuerpo completo para calcular la actividad acumulada total del cuerpo utilizada para los cálculos de dosis cruzada. Las dosis para el tumor se calcularon a partir de la autodosis utilizando solo factores S para una esfera de unidad de densidad del tamaño de 500 g (el promedio del tamaño del tumor LS174T se escaló en 2000).

Formación de imágenes: Se realizaron barridos de SPECT/CT (tomografía computerizada de emisión de un solo fotón/tomografía computerizada) y análisis de las imágenes empleando un escáner para roedores (NanoSPECT/CT™, Bioscan, Washington, D.C.) equipado con una fuente de rayos X de 8 W que actúa a 45 kV (177 μA), y un detector de rayos X CMOS-CCD de 48 μm de inclinación. Los ratones se anestesiaron en una cámara anestésica con isoflurano y se trasladaron a un lecho en un caballete para la formación de imágenes, en donde se mantuvo la anestesia con gas durante toda la duración del barrido. Después de la adquisición de un topograma de CT, se realizó un microSPECT helicoidal empleando una cámara gamma de cuatro cabezas equipada con colimadores de múltiples agujeros de alfiler (1,4 mm) y un tiempo total de barrido de 45 minutos. Las imágenes de SPECT se adquirieron a través de 360 grados en 24 proyecciones, empleando en cada una un tamaño de marco de 256 x 256 (1,0 mm píxeles). Las imágenes se reconstruyeron con un programa informático de reconstrucción iterativa Bioscan HiSPECT™ y se fusionaron con las imágenes de CT. Inmediatamente después del barrido, los ratones se sacrificaron y los tejidos y tumores se pesaron y se contaron como se describió anteriormente.

Resultados: El bsAb Sm3e/C825 se produjo y se purificó como se describió anteriormente. La biodistribución a las 24 h del bsAb y de la IgG Sm3e de origen en ratones atímicos macho que portan tumores CEA-positivos (LS174T) y CEA-negativos (C6) demuestra una acumulación específica similar en el tumor positivo al antígeno con una captación aproximadamente 4 veces mayor que el tumor negativo al antígeno. Además permaneció una alta actividad en la sangre a las 24 h, tal como se esperaba, debido a la lenta eliminación sanguínea de los compuestos que contienen Fc.

Ratones prelocalizados con 500 μg de bsAb fueron inyectados con ^{111}In -DOTA-Bn 24 h después. La biodistribución a las 4 h mostró una actividad significativamente mayor en todos los órganos debido a la unión a los bsAb. De especial consideración es la alta actividad en la sangre y la baja proporción de tumor a sangre. La alta actividad en sangre motivó el desarrollo de un agente de eliminación/bloqueo.

Los inventores modificaron un agente de bloqueo basado en dextrano empleando un aminodextrano de 500 kDa (aproximadamente 136 grupos amino por molécula de dextrano) conjugado a DOTA. El compuesto resultante contiene aproximadamente 130 moléculas de DOTA por dextrano. El compuesto de dextrano-DOTA se cargó con itrio no radiactivo y, cuando se inyecta en ratones prelocalizados una hora antes de la administración del hapteno, produce una eliminación del hapteno en la sangre fundamentalmente idéntica a la del hapteno solo. Esto sugiere que se produce un bloqueo/eliminación fundamentalmente completa de los bsAb residuales en la sangre. El dextrano-DOTA se radiomarcó con ^{111}In para caracterizar las propiedades *in vivo* del agente de dextrano solo. Se analizó la biodistribución y la eliminación de la sangre de ^{111}In -DOTA-dextrano en ratones que portan tumores. El agente de dextrano se elimina con mucha rapidez de la sangre y muestra una captación muy alta en el hígado y el bazo 4 h después de la inyección ("post-injection", p.i.).

Después se ensayó un protocolo que implica a los tres reactivos para determinar la eficacia del sistema de PRIT modificado de los inventores. Se inyectaron ratones por vía intravenosa con 500 μg de bsAb, seguido de 250 μg de agente de eliminación de dextrano-DOTA-Y 24 h después. Después de una hora más, se inyectó ^{177}Lu -DOTA 100-150 μCi por vía intravenosa. A las 4 h después de la inyección del DOTA radiomarcado, la captación tumoral era de 7,44 $\pm$ 0,41% ID/g en el tumor positivo al antígeno, 84 veces mayor que la captación tumoral observada para ^{177}Lu -

DOTA solo. La actividad también es mayor en el tejido no tumoral debido a la unión de ^{177}Lu -DOTA a bsAb residuales en el compartimento extravascular. La captación tumoral en el tumor negativo al antígeno era de $9,82 \pm 0,35\%$ ID/g a las 4 h, similar al tumor positivo al antígeno, debido a la captación no específica, por la mayor permeabilidad y retención (EPR), del bsAb. A lo largo del tiempo, la actividad tumoral en el tumor negativo al antígeno disminuyó hasta $4,23 \pm 0,54\%$ ID/g a las 24 h y $2,89 \pm 2,28\%$ ID/g a las 48 h, mientras que la actividad tumoral en el tumor positivo al antígeno aumentó hasta $14,3 \pm 1,8\%$ ID/g a las 24 h y permaneció fundamentalmente constante a las 48 h. La proporción de tumor LS174T a sangre aumentó desde 18 ± 2 a las 4 h hasta 380 ± 90 a las 24 h, y fue mayor que 450 a las 48 h. A las 48 h, la actividad en sangre no pudo medirse por encima del fondo. La proporción de LS174T a riñón aumentó desde aproximadamente 8 a las 4 h a aproximadamente 20 a las 24 y 48 h. Las imágenes de SPECT/CT confirmaron los datos de biodistribución cuantitativa con una alta señal de PSECT en los tumores positivos a CEA, una menor señal en el tumor negativo a CEA, y sin señal observable en tejido no tumoral.

A partir de los datos de biodistribución en órganos de PRIT, se calculó la dosis de radiación para el riñón, hígado, médula roja y tumor positivo al antígeno para un hombre de 70 kg para ^{90}Y and ^{177}Lu . Hay que señalar que estos cálculos se generan a partir de los datos de biodistribución en ratones y, por tanto, son aproximaciones; serán necesarios datos clínicos en seres humanos para determinar una dosimetría más precisa. Las dosis calculadas para el riñón, hígado y médula roja se calcularon a partir de la autodosis y la dosis cruzada, empleándose la actividad en el cuerpo entero para determinar la dosis cruzada. La dosis calculada para el tumor se determinó solo a partir de la autodosis. Las toxicidades limitantes de la dosis (TD5/5) para el hígado, el riñón y la médula ósea calculadas a partir de radiación de haces externos fueron de 30 Gy, 23 Gy, y 1,5 Gy, respectivamente (Emami *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol., Phys.*, 21:109-122, 1991). A partir de los cálculos de dosis de radiación se predice que el órgano limitante de la dosis es la médula roja para los haptenos de ^{90}Y -DOTA y ^{177}Lu -DOTA. A una dosis en médula roja de 1,5 Gy, la dosis calculada al tumor es de 98 Gy para ^{90}Y , y de 156 Gy para ^{177}Lu . En general se piensa que una dosis mayor que 50 Gy es suficiente para erradicar la mayoría de los tumores (Govindan *et al.*, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 3:90-98, 2000).

El protocolo de prelocalización descrito anteriormente se empleó para analizar el efecto de la afinidad sobre la captación tumoral de DOTA radiomarcado. El bsAb muestra unas afinidades de aproximadamente 10 nM para ^{111}In -DOTA, aproximadamente 1 nM para ^{111}In -DOTA-Bn, aproximadamente 100 pM para ^{177}Lu -DOTA, y aproximadamente 10 pM para ^{177}Lu -DOTA-Bn. Se determinó la biodistribución en órganos/tejidos a las 24 h en ratones que portan tumores con cada uno de los cuatro compuestos de DOTA radiomarcados. Las imágenes de SPECT/CT de un ratón de cada grupo mostraron que es necesaria una afinidad nanomolar de al menos un dígito para observar una señal en el tumor positivo al antígeno. La actividad a las 24 h en el tumor LS174T aumentó desde $0,5 \pm 0,1\%$ ID/g para la afinidad de aproximadamente 10 nM, hasta $1,6 \pm 0,3\%$ ID/g para una afinidad de aproximadamente 1 nM, y hasta $14,3 \pm 1,8\%$ ID/g para una afinidad de aproximadamente 100 pM. La actividad tumoral para la afinidad de aproximadamente 10 pM no se diferencia significativamente de la de la afinidad de aproximadamente 100 pM. La actividad en el tumor negativo al antígeno C6 aumenta con la afinidad, probablemente debido a la captación no específica de bsAb. La actividad en los tejidos no tumorales también es mayor para los compuestos de mayor afinidad debido a la mayor afinidad de unión a los bsAb residuales. La proporción de tumor a riñón aumentó desde $1,2 \pm 0,4$ para aproximadamente 10 nM hasta 17 ± 3 para aproximadamente 100 pM, pero después disminuyó hasta 10 ± 2 para una afinidad de aproximadamente 10 pM debido a la mayor captación en el riñón con una captación tumoral similar.

Los resultados experimentales a las 24 h de captación tumoral frente a la afinidad se compararon con predicciones matemáticas basadas en un modelo compartimental previamente publicado de captación tumoral (Schmidt y Wittrup, *Mol. Cancer. Ther.*, 8:2861-2871, 2009). Se calculó la permeabilidad vascular a partir del modelo de dos poros de la pared capilar para una molécula de 1 kDa. Se calculó que la densidad superficial era de 2×10^5 sitios de unión a DOTA por célula, basándose en la acumulación tumoral a las 24 h de bsAb, la actividad a las 24 h del scFv en suero, y la tasa de internalización a las 15 h de CEA que provoca que aproximadamente la mitad del bsAb acumulado se internalice y, por tanto, resulte inaccesible a la unión. Se calcularon los parámetros de eliminación de la sangre a partir de un ajuste biexponencial de la eliminación en sangre *in vivo* medida para ^{177}Lu -DOTA.

Los resultados experimentales pueden cotejarse bien con la predicción del modelo, aumentando significativamente la captación tumoral a las 24 h desde 1 nM a 100 pM de afinidad, y después alcanzando una meseta con una mejora adicional en la afinidad de 100 pM a 10 pM que no produce una mejora significativa en la afinidad desde 100 pM a 10 pM que no produce una mejora significativa en la actividad tumoral a las 24 h.

Análisis: Se presenta un nuevo método para una radioinmunoterapia prelocalizada que emplea un bsAb de IgG-scFv, un agente de bloqueo basado en dextrano, y DOTA radiomarcado. El sistema de PRIT modificado se ensayó en ratones con xenoinjertos que portan tumores CEA-positivos y CEA-negativos. El bsAb muestra una afinidad de aproximadamente 100 pM por ^{177}Lu -DOTA. Se ha demostrado previamente que ^{177}Lu -DOTA muestra una eliminación del cuerpo entero muy rápida en ratones. En la presente se demuestra que la elevada captación y retención del tumor LS174T de ^{177}Lu -DOTA, con una rápida eliminación del tejido no tumoral, produce las proporciones más altas indicadas de tumor a sangre y de tumor a riñón a las 48 h p.i. para el transporte dirigido de CEA.

Se observó una cantidad significativa de captación de ^{177}Lu -DOTA en tumores CEA-negativos en los momentos tempranos. Una mayor permeabilidad y retención (EPR) produce una acumulación en el tumor no específica de compuestos de alto peso molecular. Aunque se observa una captación de bsAb aproximadamente 4 veces mayor en los tumores LS174T frente a los tumores C6, la diferencia en la captación de haptenos en los momentos tempranos sería menor porque una fracción significativa del bsAb localizada en los tumores LS174T es inaccesible debido a la semivida de internalización de 15 h de CEA (Schmidt *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2008), mientras que todos los bsAb en los tumores C6 resultan accesible a la unión de haptenos. Esto es coherente con la observación de actividades similares en los dos tumores en los momentos tempranos. En momentos más tardíos, el anticuerpo no unido se intravasa fuera del tumor CEA-negativo, mientras que el anticuerpo unido a CEA en los tumores LS174T internaliza los compuestos de ^{177}Lu -DOTA, por lo que el radiomarcador queda atrapado dentro de la célula.

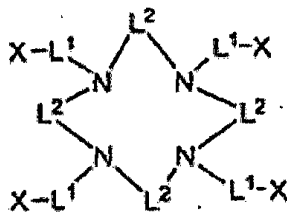
La estrategia de PRIT presentada en la presente se origina de una perspectiva de diseño de modificación lógica. Se ha empleado la modelización matemática para predecir la afinidad necesaria para una captura eficaz del hapteno y la retención en el sitio del tumor. Después se modificó un bsAb similar a IgG para conservar la lenta eliminación de la sangre que produce una alta captación tumoral, para conservar la función inmunológica secundaria potencialmente beneficiosa, y para permitir una producción y purificación idéntica a la de una IgG. Los inventores diseñaron su sistema para emplear simplemente DOTA con el hapteno, sin que sean necesarias más síntesis o modificaciones, con lo que se eliminan problemas con la escisión del marcador y la estabilidad del péptido (van Gog *et al.*, *Nucl. Med., Biol.*, 25:611-619, 1998; van Schaijk *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11:7130s-7136s, 2005). El DOTA quelado al gadolinio se ha administrado a sujetos humanos en concentraciones milimolares y tiene un perfil de seguridad establecido. Los quelatos de metal y DOTA muestran una rápida eliminación de la sangre y se observa la eliminación del cuerpo entero en ratones y seres humanos (Le Mignon *et al.*, *Invest. Radiol.*, 25:933-937, 1990). Cuando se compara sistemáticamente con otros compuestos basados en DOTA, ^{177}Lu -DOTA muestra una captación en hígado e intestino ligeramente menor a las 4 h p.i., comparado con DOTA-biotina y DOTA-Bn radiomarcados en ratones CD1 normales. Esto sugiere que DOTA muestra una eliminación renal fundamentalmente completa, mientras que DOTA-biotina y DOTA-Bn muestran algo de eliminación a través de la bilis. Este efecto puede ser más o menos pronunciado en seres humanos.

La eliminación de tejidos no tumorales de DOTA no es siquiera tan rápida en ratones prelocalizados con bsAb, incluso con la adición del agente de eliminación de dextrano, debido a la eliminación incompleta que deja anticuerpos residuales. Múltiples dosis del agente de eliminación o la infusión del agente de eliminación a lo largo de un periodo de tiempo produciría probablemente una eliminación del bsAb más completa del tejido no tumoral, puesto que los bsAb residuales en el espacio extravascular se volverían a reciclar hacia la corriente sanguínea a lo largo del tiempo (Press *et al.*, *Blood*, 98:2535-2543, 2001). Una menor masa de dextrano también mejoraría la eliminación de bsAb; sin embargo, sería necesario equilibrar la eliminación mejorada con una posible captación tumoral de agentes más pequeños que produciría el bloqueo de los sitios de unión del hapteno.

Los inventores han descubierto unas excelentes proporciones de tumor:sangre, que aparecieron a pesar de la dosis excepcionalmente alta de bsAb. Otros estudios de métodos de prelocalización indican unas proporciones decrecientes de tumor:sangre a medida que aumentan las dosis de bsAb (Sharkey *et al.*, *Nat. Med.*, 11:1250-1255, 2005; van Schaijk *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11:7130s-7136s, 2005). El método de los inventores produce un alto número de sitios de unión del hapteno en el tumor en el momento de la dosificación del hapteno. Esto es importante, puesto que el número de sitios de unión del hapteno está directamente relacionado con el número de radioisótopos que pueden ser capturados y retenidos en el sitio del tumor, lo cual influye en la máxima dosis posible. Aunque la radioinmunoterapia prelocalizada en tres etapas añade complejidad frente a los procedimientos de dos etapas, aquella permite administrar unas dosis más altas de bsAb, con lo cual se logran unas dosis tumorales más altas, así como una distribución más homogénea dentro del tumor. Además, permite la aparición de posibles efectos inmunológicos secundarios que surgen del dominio Fc retenido que pueden ser significativos (Sharkey *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 50:444-453, 2009). Las estrategias de dos etapas pueden ser suficientes para la formación de imágenes moleculares para mejorar la búsqueda y estadificación del cáncer (Sharkey *et al.*, *Nat. Med.*, 11:1250-1255, 2005; Sharkey *et al.*, *Radiology* 246:497-507, 2008). Sin embargo, se anticipa que el mayor número de sitios de unión del hapteno que ofrecen las estrategias de tres etapas será importante para la terapia.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una proteína modificada multiespecífica que comprende una primera secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina, una proteína de andamiaje, o una porción de unión al antígeno de una inmunoglobulina o una proteína de andamiaje que se une específicamente a una molécula diana, y una segunda secuencia de aminoácidos de un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une específicamente a un quelato de metal que comprende DOTA, o uno de sus variantes activos, en la que el scFv comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 1-244 de SEQ ID NO:11 en la figura 3, según se representa en SEQ ID NO:12.
- 2.- La proteína modificada de la reivindicación 1, en la que la primera secuencia de aminoácidos comprende una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina, y en la que la primera secuencia de aminoácidos está condensada con o sin un conector con el scFv.
- 3.- La proteína modificada de la reivindicación 2, que es un anticuerpo biespecífico que comprende un scFv condensado con una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina, y que comprende además una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina.
- 4.- La proteína modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el scFv está humanizado.
- 5.- La proteína modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la diana es un antígeno del cáncer, una molécula pequeña, un compuesto inerte, o una proteína expresada por una célula eucariota, una célula procariota o un virus.
- 6.- La proteína modificada de la reivindicación 5, en la que el antígeno del cáncer es el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno A33, HER-2/neu, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, MUM-1, CDK4, MUC-1, N-acetilglucosaminiltransferasa, p15, gp75, beta-catenina, proteína E6 del papilomavirus humano, proteína E7 del papilomavirus humano, ErbB2, o antígeno del cáncer 125 (CA-125).
- 7.- La proteína modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la primera secuencia de aminoácidos comprende una proteína de andamiaje, tal como el dominio de fibronectina de tipo III (Fn3).
- 8.- La proteína modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la proteína modificada comprende una inmunoglobulina que comprende (a) una región Fc, y/o (b) una mutación que atenúa la glicosilación.
- 9.- La proteína modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el variante activo de DOTA es un compuesto de fórmula I:



I

o su sal farmacéuticamente aceptable; en la que:

- 30 cada X se selecciona independientemente de carboxi, $-C(=O)NHR^d$, $-P(=O)(OH)(OR^d)$, $-S(=O)OH$, $-S(=O)_2OH$, $-SH$, $-OH$, $-OC(=O)NHR^d$, $-OC(=S)NHR^d$, $-NHC(=O)NR^eR^f$, $-NHC(=S)NR^eR^f$, $-NR^eC(=O)NHR^f$, y $-NR^eC(=S)NHR^f$;
- 35 cada L^1 es, independientemente, alquileo C_{1-6} , alquilenilo C_{1-6} , o alquinileno C_{1-6} , cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 grupos seleccionados independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi C_{1-4} , haloalcoxi C_{1-4} , alquiltio C_{1-4} , alquilsulfonilo C_{1-4} , alquilsulfonilo C_{1-4} , amino, alquilamino C_{1-4} , dialquilamino C_{1-4} , (alquil C_{1-4})carbonilo, carboxi, (alcoxi C_{1-4})carbonilo, (alquil C_{1-4})carbonilamino, (dialquil C_{1-4})carbonilamino, (alcoxi C_{1-4})carbonilamino, (alcoxi C_{1-4})carbonil-(alquil C_{1-4})amino, carbamilo, (alquil C_{1-4})carbamilo, y (dialquil C_{1-4})carbamilo;
- 40 cada L^2 es independientemente un alquileo de cadena lineal C_{2-4} , que está opcionalmente sustituido con un grupo R^1 seleccionado independientemente y que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos seleccionados independientemente de alquilo C_{1-4} y haloalquilo C_{1-4} ;
- cada R^1 se selecciona independientemente de H, $-D^1-D^2-D^3$, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxi C_{1-6} , haloalcoxi C_{1-6} , alquiltio C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} , alquilsulfonilo C_{1-6} , amino, alquilamino C_{1-6} , dialquilamino C_{1-6} , (alquil C_{1-4})carbonilo, carboxi, (alcoxi C_{1-6})carbonilo, (alquil C_{1-6})carbonilamino, (dialquil C_{1-6})carbonilamino, (alcoxi C_{1-6})carbonilamino, (alcoxi C_{1-6})carbonil-(alquil C_{1-6})amino, carbamilo, (alquil C_{1-6})carbamilo, y (dialquil C_{1-6})carbamilo;

cada D¹ se selecciona independientemente de (arilo C₆₋₁₀)-alquilo C₁₋₄, (heteroaril C₁₋₉)-alquilo C₁₋₄, (cicloalquil C₃₋₁₀)-alquilo C₁₋₄, (heterocicloalquil C₂₋₉)-alquilo C₁₋₄, alquilenilo C₁₋₈, alquenileno C₁₋₈, y alquinileno C₁₋₈; en la que dichos alquilenilo C₁₋₈, alquenileno C₁₋₈, y alquinileno C₁₋₈ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R⁴ seleccionados independientemente; y en la que dichos (arilo C₆₋₁₀)-alquilo C₁₋₄, (heteroaril C₁₋₉)-alquilo C₁₋₄, (cicloalquil C₃₋₁₀)-alquilo C₁₋₄, y (heterocicloalquil C₂₋₉)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R⁵ seleccionados independientemente;

cada D² está independientemente ausente o es alquilenilo de cadena lineal C₁₋₂₀, en la que de 1 a 6 grupos metileno no adyacentes de dicho alquilenilo de cadena lineal C₁₋₂₀ están cada uno opcionalmente reemplazados por un resto -D⁴ seleccionado independientemente, con la condición de que al menos una unidad de metileno en dicho alquilenilo de cadena lineal C₁₋₂₀ no está opcionalmente reemplazado por un resto -D⁴; en la que dicho alquilenilo de cadena lineal C₁₋₂₀ está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, alcoxilo C₁₋₄, haloalcoxilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, dialquilamino C₁₋₄, (alquil C₁₋₄)carbonilo, carboxi, (alcoxilo C₁₋₄)carbonilo, (alquil C₁₋₄)carbonilamino, (dialquil C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxilo C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxilo C₁₋₄)carbonil-(alquil C₁₋₄)amino, carbamilo, (alquil C₁₋₄)carbamilo, y (dialquil C₁₋₄)carbamilo;

cada D³ se selecciona independientemente de H, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₁₄, (cicloalquil C₃₋₁₄)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₁₄, (heterocicloalquil C₂₋₁₄)-alquilo C₁₋₄, arilo C₆₋₁₄, (aril C₆₋₁₄)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₁₃, (heteroaril C₁₋₁₃)-alquilo C₁₋₄; en la que dichos alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, y alquinilo C₂₋₆ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R⁶ seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C₃₋₁₄, (cicloalquil C₃₋₁₄)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₁₄, (heterocicloalquil C₂₋₁₄)-alquilo C₁₋₄, arilo C₆₋₁₄, (aril C₆₋₁₄)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₁₃, (heteroaril C₁₋₁₃)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R⁷ seleccionados independientemente;

cada D⁴ se selecciona independientemente de -O-, -S-, -NR^aC(=O)-, -NR^aC(=S)-, -NR^bC(=O)NR^c-, -NR^bC(=S)NR^c-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -S(=O)NR^a-, -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=O)O-, -OC(=O)NR^a-, -OC(=S)NR^a-, -NR^bS(=O)NR^c-, y -NR^bS(=O)₂NR^c-;

cada R⁴ y R⁶ se selecciona independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alcoxilo C₁₋₄, haloalcoxilo C₁₋₄, alquiltio C₁₋₄, alquilsulfonilo C₁₋₄, alquilsulfonilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, dialquilamino C₁₋₄, (alquil C₁₋₄)carbonilo, carboxi, (alcoxilo C₁₋₄)carbonilo, (alquil C₁₋₄)carbonilamino, (dialquil C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxilo C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxilo C₁₋₄)carbonil-(alquil C₁₋₄)amino, carbamilo, (alquil C₁₋₄)carbamilo, y (dialquil C₁₋₄)carbamilo;

cada R⁵ se selecciona independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C₁₋₄, alquilenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, alcoxilo C₁₋₄, haloalcoxilo C₁₋₄, alquiltio C₁₋₄, alquilsulfonilo C₁₋₄, alquilsulfonilo C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, dialquilamino C₁₋₄, (alquil C₁₋₄)carbonilo, carboxi, (alcoxilo C₁₋₄)carbonilo, (alquil C₁₋₄)carbonilamino, (dialquil C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxilo C₁₋₄)carbonilamino, (alcoxilo C₁₋₄)carbonil-(alquil C₁₋₄)amino, carbamilo, (alquil C₁₋₄)carbamilo, y (dialquil C₁₋₄)carbamilo;

cada R⁷ se selecciona independientemente de halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, alquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄, -OR^o, -SR^o, -S(=O)R^p, -S(=O)₂R^p, -S(=O)NR^sR^t, -C(=O)R^p, -C(=O)OR^p, -C(=O)NR^sR^t, -OC(=O)R^p, -OC(=O)NR^sR^t, -NR^sR^t, -NR^qC(=O)R^r, -NR^qC(=O)OR^r, -NR^qC(=O)NR^r, -NR^qS(=O)₂R^r, y -NR^pS(=O)₂NR^sR^t, en la que dichos alquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R' seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, (heteroaril C₁₋₄)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R'' seleccionados independientemente;

cada R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, y R^f se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄; en la que dichos alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, y alquinilo C₂₋₆ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^w seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^x seleccionados independientemente;

cada R^o, R^p, R^q, R^r, R^s, y R^t están cada uno seleccionado independientemente de H, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, alquinilo C₂₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄; en la que dichos alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, y alquinilo C₂₋₆ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^y seleccionados independientemente; y en la que dichos cicloalquilo C₃₋₇, (cicloalquil C₃₋₇)-alquilo C₁₋₄, heterocicloalquilo C₂₋₇, (heterocicloalquil C₂₋₇)-alquilo C₁₋₄, fenilo, (fenil)-alquilo C₁₋₄, heteroarilo C₁₋₇, y (heteroaril C₁₋₇)-alquilo C₁₋₄ están cada uno opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, o 4 grupos R^z seleccionados independientemente;

cada R', R^w y R^y se selecciona independientemente de hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi C₁₋₄, haloalcoxi C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, y dialquilamino C₁₋₄;

y cada R'', R^x y R^z se selecciona independientemente de hidroxilo, halógeno, ciano, nitro, alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, haloalcoxi C₁₋₄, amino, alquilamino C₁₋₄, y dialquilamino C₁₋₄;

5 con la condición de la que no se exceda la valencia de cada átomo en los restos opcionalmente sustituidos.

10.- Un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica la proteína modificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11.- Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.

12.- Una célula hospedante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 11.

10 13.- Una composición farmacéutica que comprende la proteína modificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

14.- Una proteína modificada de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso como un medicamento.

15.- El uso de una proteína modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo o una enfermedad infecciosa, en el que la proteína modificada se dirige a un antígeno expresado por una célula que está proliferando de una manera no deseada o un

15 antígeno expresado por un agente infeccioso.

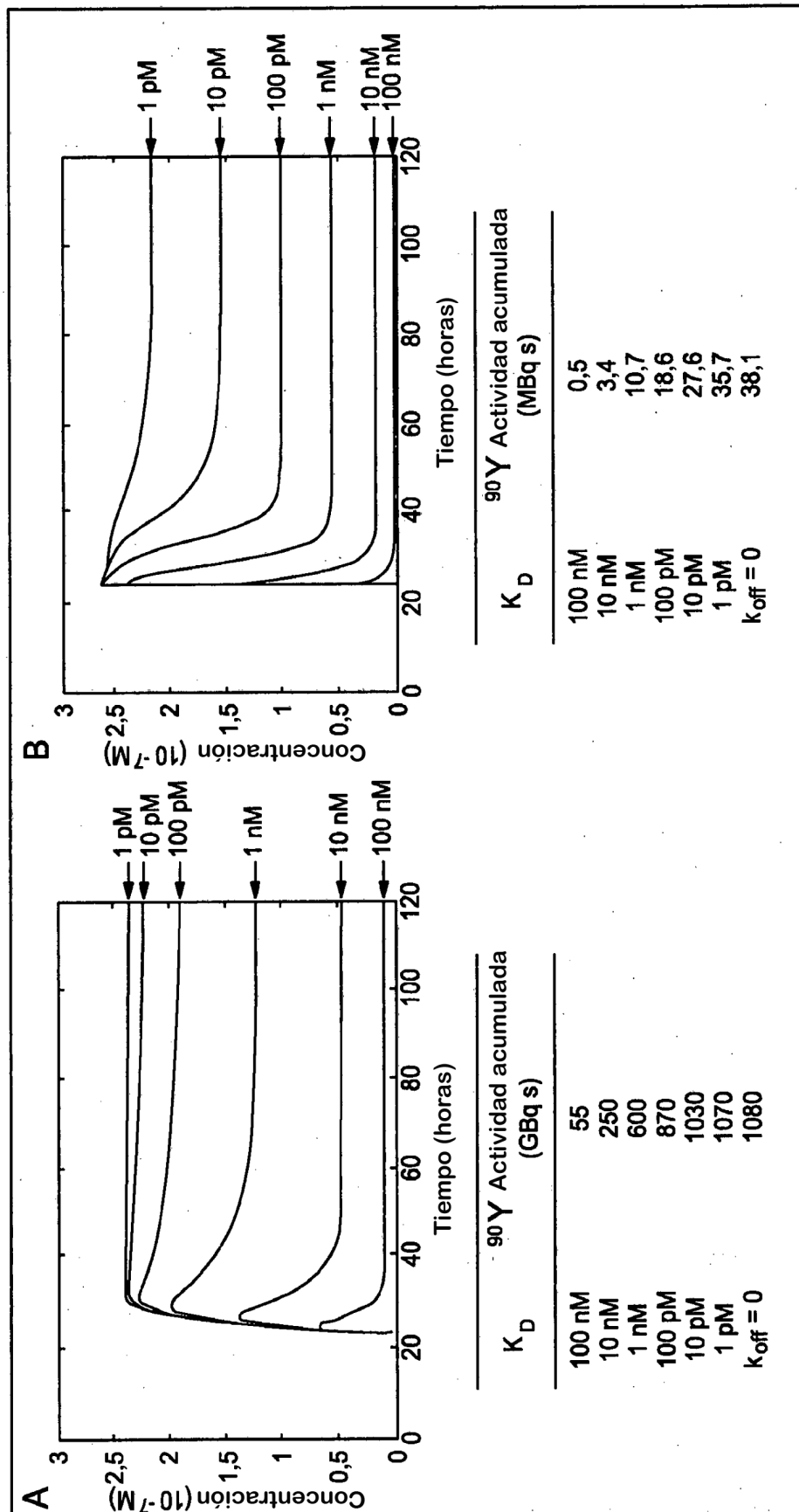


FIG. 1

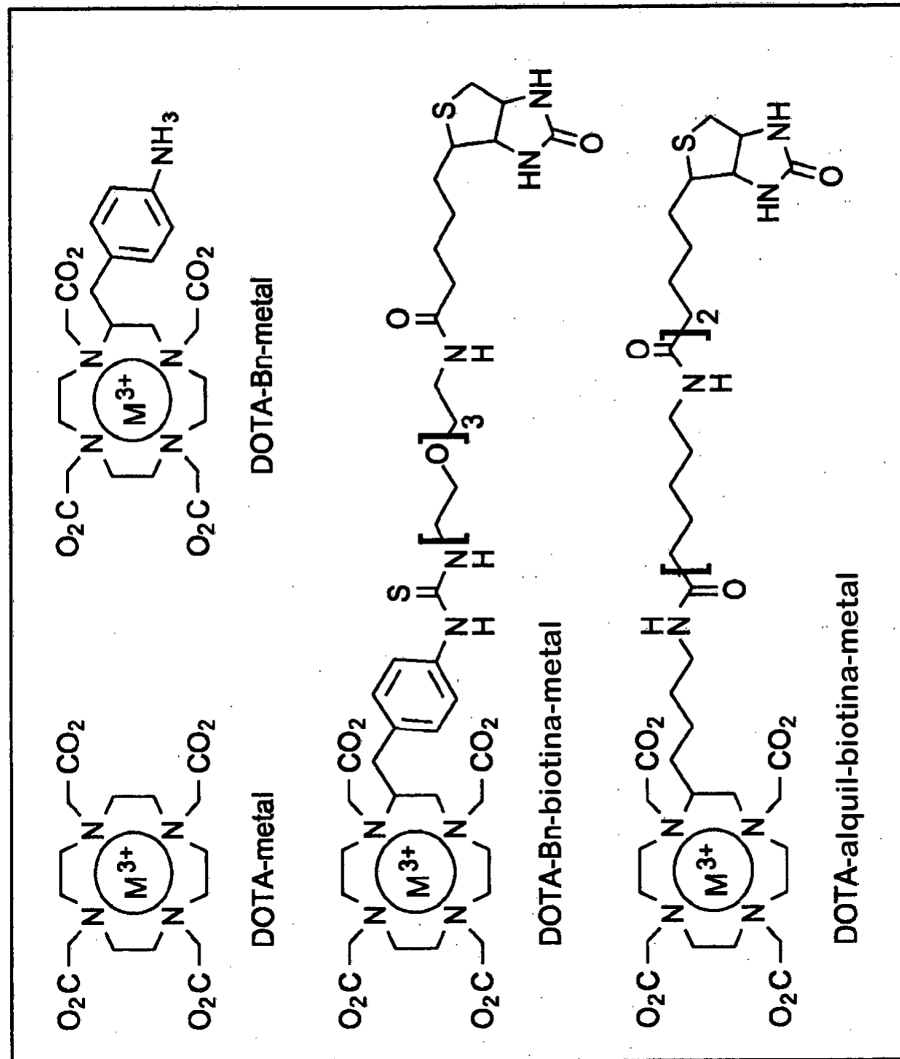


FIG. 2

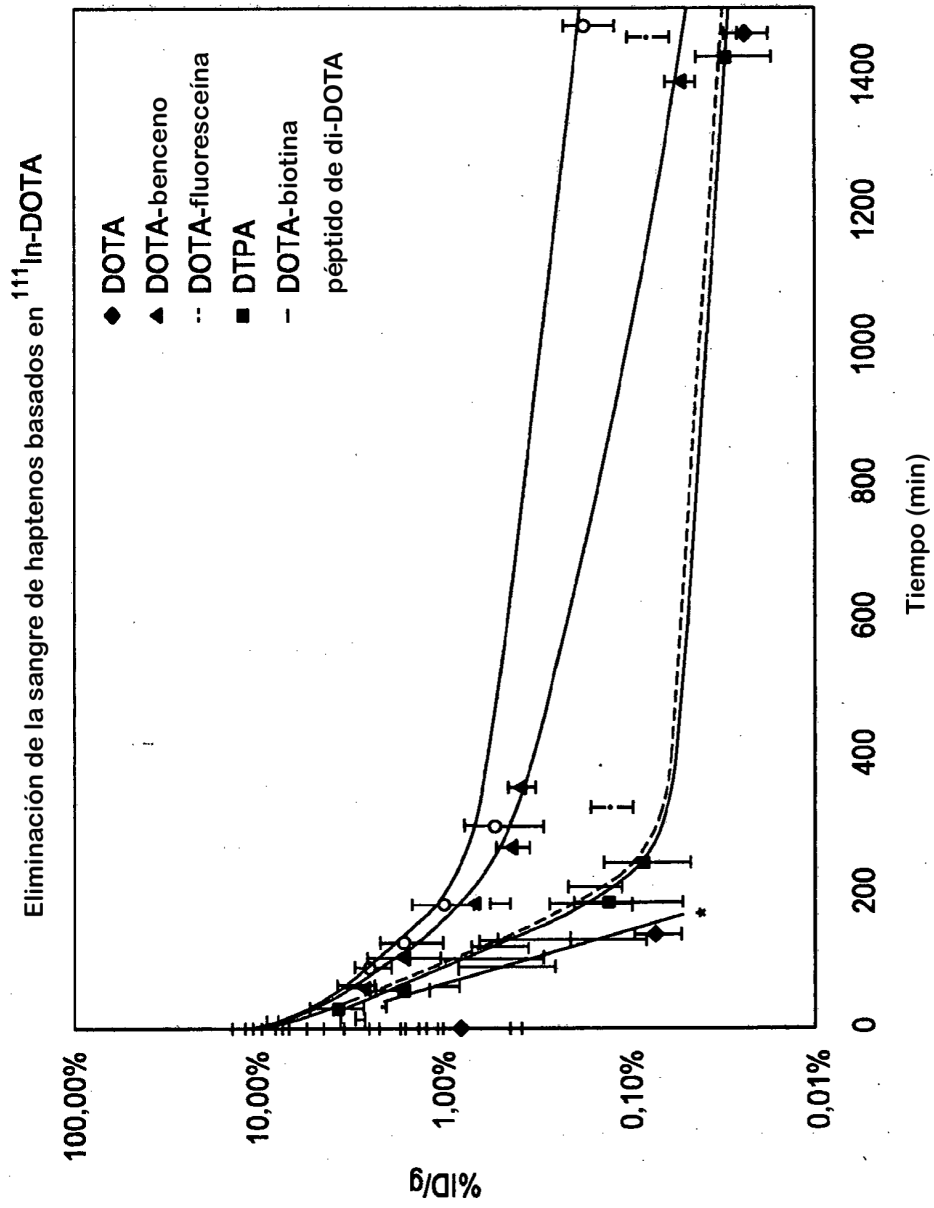
FIG. 3A

FIG. 3B

	190	200	210	220	230	240	250	260	270	
2dds2g2										
C8.2-1	TGLIGNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGTRLTVLGSEQKLISEEDL**IE	SEQ ID NO: 35								
C8.2-2	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 5			
C8.2-3	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 7			
C8.2-4	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 9			
C8.2-5	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 11			
C8.2-6	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 13			
C.2.1	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 15			
C7.2.2	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 17			
C7.3.3	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 19			
C7.3.4	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 21			
C7.3.5	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 23			
C7.3.6	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 25			
C7.3.7	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 27			
C7.3.8	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 29			
C7.3.9	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 31			
C7.3.10	H.....	D.....	I.....	L	CFVVF*SLGYWVWY*IDCF	WIXT.AYF*RG.VIARDLXITTV*MXQ	SEQ ID NO: 33			

SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14
16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, Y 34
TERMINAN EN EL RESTO 244 DE LOS RESPECTIVOS
CLONES MOSTRADOS EN LA PRESENTE.

FIG. 3C



LOS PUNTOS DE DATOS REPRESENTAN EL PROMEDIO +/- LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA 3 O 4 RATONES
 LAS LÍNEAS CONTINUAS REPRESENTAN UN AJUSTE BIEXPONENCIAL DE LOS DATOS
 *OTROS PUNTOS DE TIEMPO DE DOTA NO PRESENTABAN ACTIVIDAD MENSURABLE

FIG. 4

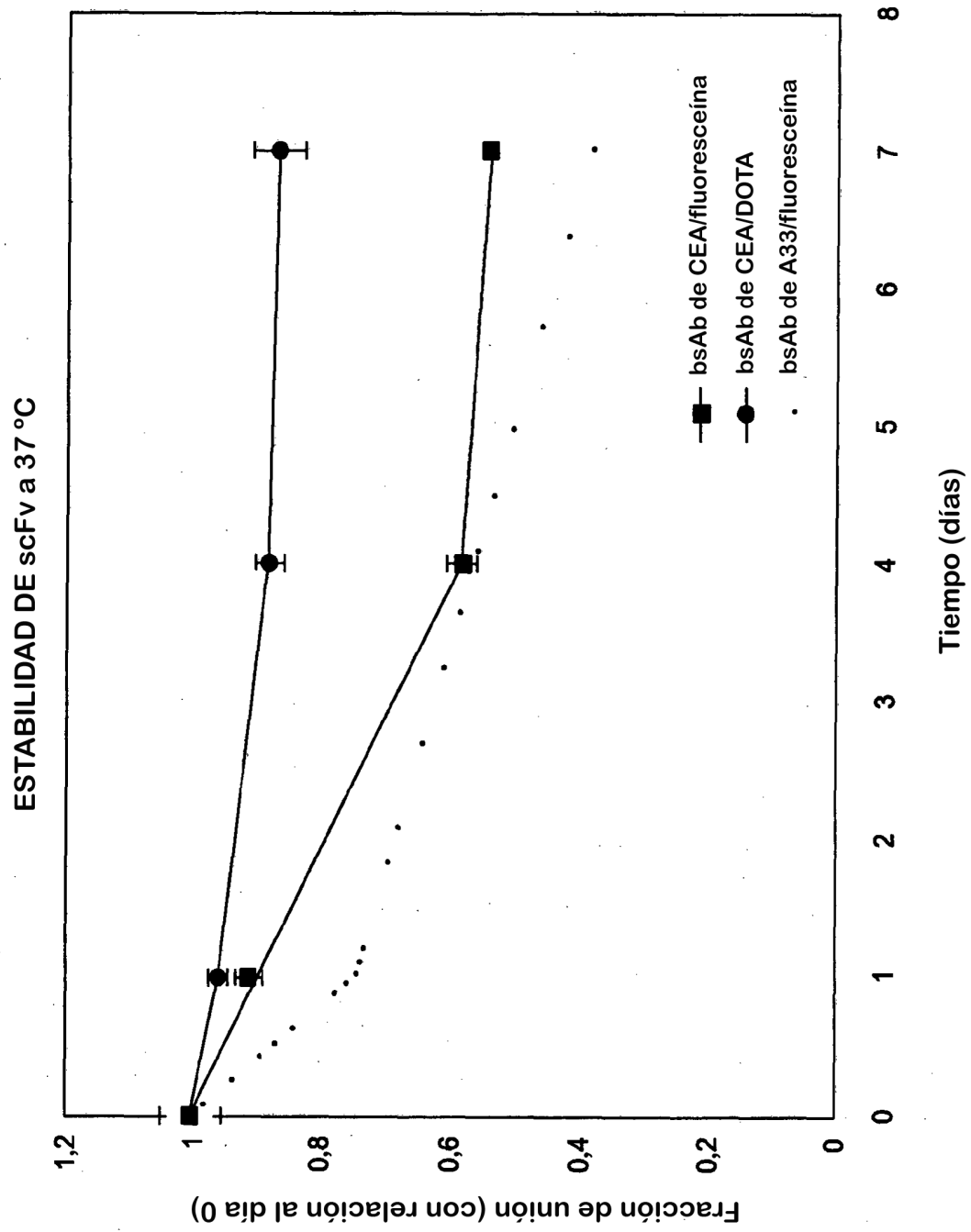


FIG. 5

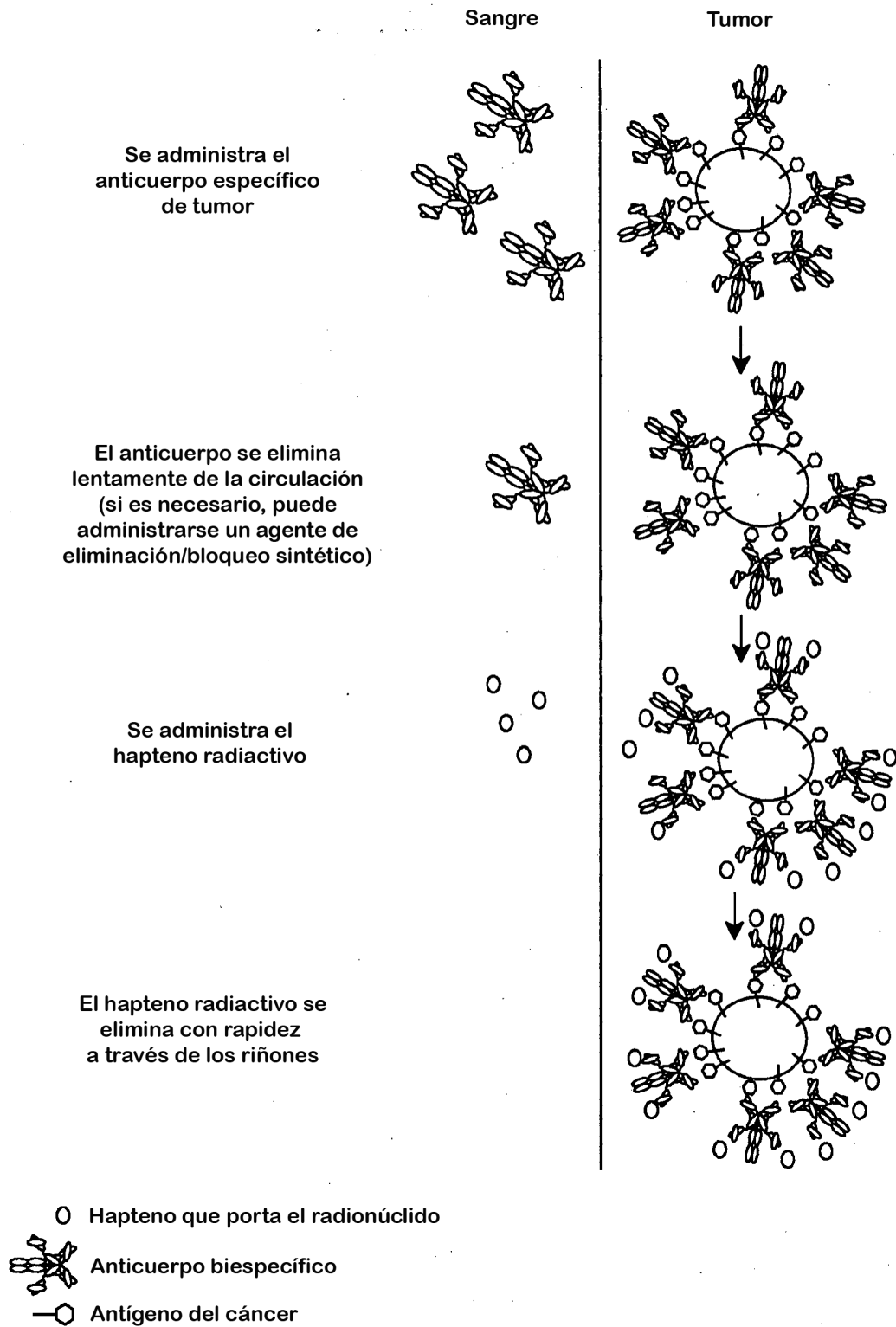


FIG. 6

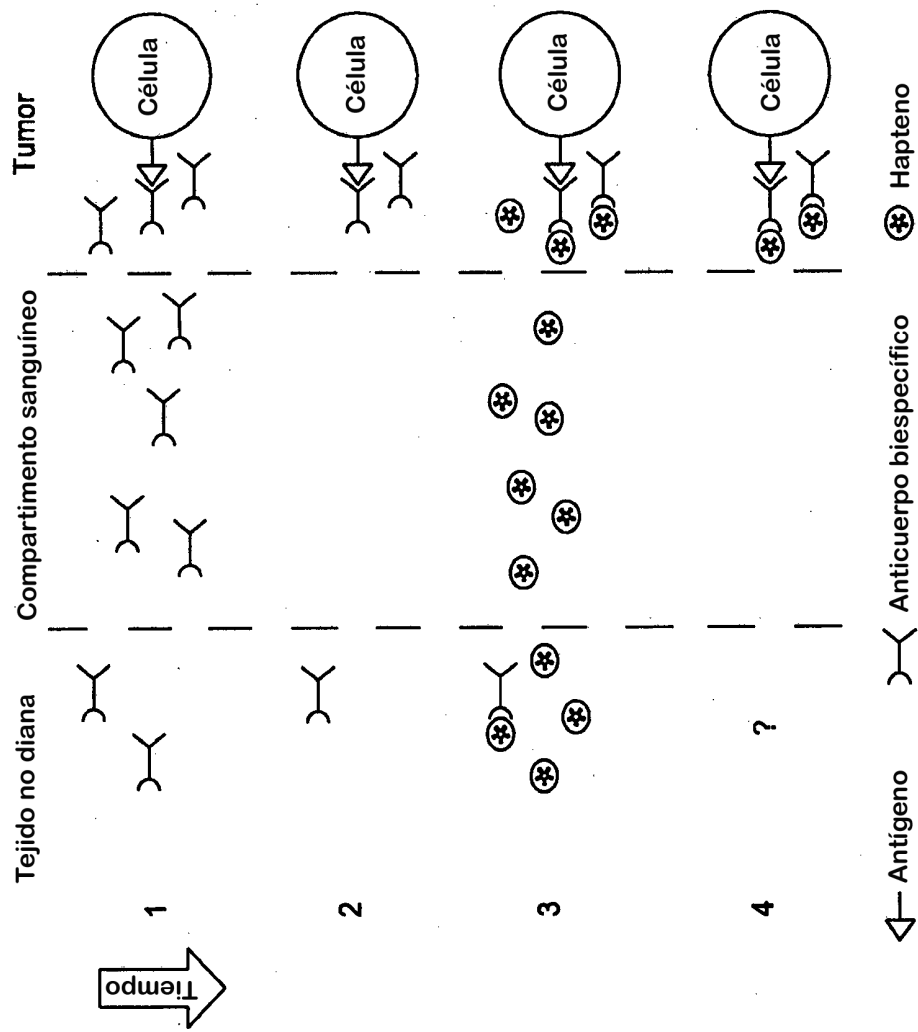


FIG. 7

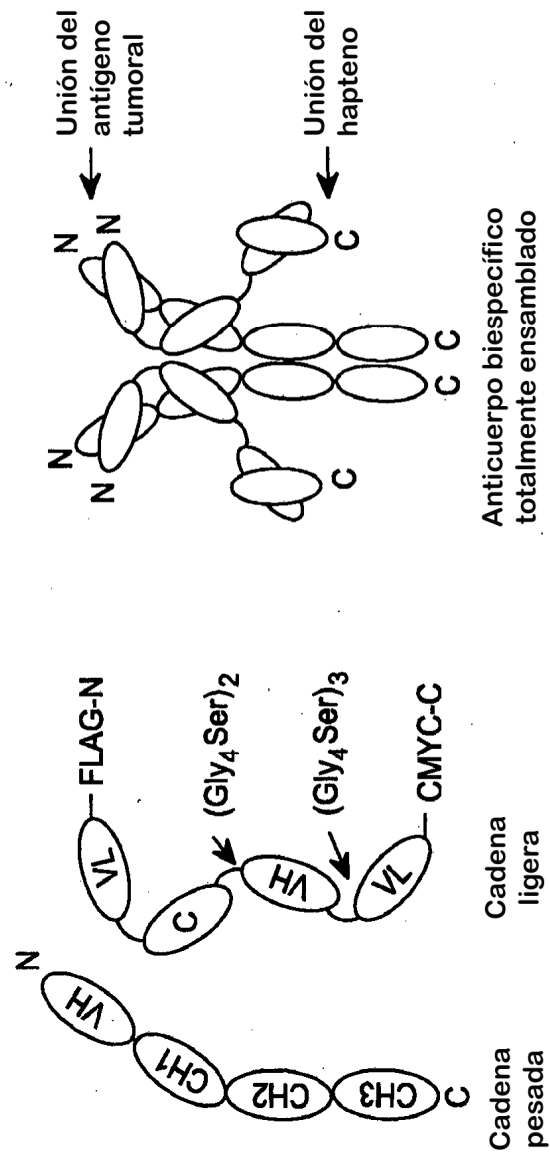


FIG. 8