

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 340**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2008 PCT/GB2008/003283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09040550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08806434 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2201038**

54 Título: **Materiales y métodos relativos a la modificación de la unión de anticuerpos**

30 Prioridad:

**26.09.2007 GB 0718843**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2017**

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED  
(100.0%)**

**Angel Building, 407 St John Street  
London, EC1V 4AD , GB**

72 Inventor/es:

**CHESTER, KERRY;  
KOGELBERG, HEIDE y  
MARSHALL, JOHN F.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 640 340 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

Materiales y métodos relativos a la modificación de la unión de anticuerpos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para modificar la unión de anticuerpos, y más particularmente a la obtención de anticuerpos insertando una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una diana en una región determinante de complementariedad de un anticuerpo parental de manera que el anticuerpo que se obtiene es capaz de unirse a la diana. La presente invención se refiere además a métodos de producción de anticuerpos.

10 **Antecedentes de la invención**

Las integrinas son una familia de receptores transmembrana heterodiméricos clase I. Las integrinas individuales comprenden una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  en asociación no covalente y se sabe que existen al menos 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  que pueden formar 24 heterodímeros diferentes. Están implicadas en numerosas interacciones célula-matriz y célula-célula y facilitan la adhesión celular, proliferación, migración e invasión. Estos procesos se producen en varios procesos normales y patológicos, incluyendo la cicatrización de heridas, la inflamación y el crecimiento tumoral y la metástasis.

La  $\alpha v \beta 6$  es una integrina restringida a células epiteliales y se ha demostrado que se expresa en el epitelio maligno pero no en el normal. Se ha informado de la expresión *de novo* de esta integrina en los carcinomas de células escamosas orales (SCC) y tejidos cancerosos ováricos, y líneas celulares cancerosas y una sobre-expresión en adenocarcinomas de mama, y cáncer ovárico, carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas oral y adenocarcinomas gastroenteropancreáticos, en particular en adenocarcinomas ductales pancreáticos. También se ha demostrado que la expresión de  $\beta 6$  en una línea celular de SCC poco invasivo aumentaba la migración sobre fibronectina y la invasión a través de la membrana basal reconstituida, sugiriendo un papel primario de esta integrina en la invasión oral del SCC y la metástasis. La activación transcripcional de  $\beta 6$  y la siguiente expresión de  $\alpha v \beta 6$  se ha observado durante la transición mesenquimática-epitelial (EMT), que permite a las células de carcinoma de colon adquirir un fenotipo más agresivo. Además, el análisis de las muestras del carcinoma colorrectal revelaba que la expresión elevada se asocia con un tiempo de supervivencia significativamente reducido de los pacientes.

El documento WO2007/008712 describe anticuerpos anti- $\alpha v \beta 6$  y los usos de los mismos.

El documento WO2007/039728 (Cancer Research Technology Limited) desvela experimentos en los que se investigan ligandos del péptido  $\alpha v \beta 6$  que comprenden la secuencia RGD $\beta$ LXXL/I, en la que LXXL/I está contenida en una estructura helicoidal. El uso de este motivo peptídico se origina de los estudios en los que la expresión de  $\alpha v \beta 6$  está implicada en la activación del TGF- $\beta$  autocrino en células post-EMT. La proteína asociada a latencia (LAP) del complejo latente LAP-TGF- $\beta$ 1 es un ligando conocido para  $\alpha v \beta 6$  y la unión tiene un papel en la activación del TGF- $\beta$ 1. La proteína LAP contiene la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), un conocido motivo de unión para la mayoría de las integrinas. Además, un ligando adicional para  $\alpha v \beta 6$  es la proteína vírica 1 (VP1) del virus de la enfermedad del pie y la boca (FMDV), que también contiene el motivo RGD. El FMDV utiliza  $\alpha v \beta 6$  para unirse a las células huésped y la integrina muy probablemente también tiene un papel en la captación del virus en los endosomas. La unión de VP1 específicamente a  $\alpha v \beta 6$  está mediada por restos inmediatamente siguientes e incluyen el ácido aspártico del motivo RGD; la secuencia DLXXL se ha identificado como un motivo adicional de unión a  $\alpha v \beta 6$  por su capacidad para inhibir las interacciones de  $\alpha v \beta 6$ -fibronectina. Los péptidos en los que se mutó cualquiera de los dos restos de leucina eran peores como inhibidores de FMDV C-S8c1 en el reconocimiento e infección de células susceptibles. El altamente relacionado motivo GFDLXXI está presente en la proteína LAP y se debería preverse que también está implicado en la unión de alta afinidad con  $\alpha v \beta 6$ .

Un estudio previo modificaba un motivo RGD y tres repeticiones de RGD en el bucle CRD3 de una cadena pesada de anticuerpo quimérico de inmunoglobulina humana/de ratón y demostraba que el anticuerpo reconocía específicamente la integrina  $\alpha v \beta 3$  (20). De manera similar se creó un anticuerpo de unión a gp120 insertando un péptido del receptor CD4 en el bucle CRD3 (21) y un anticuerpo de unión a ADN reemplazando el bucle CDR3 con una secuencia de una proteína básica hélice-bucle-hélice de clase B (22). Más recientemente, se injertaron secuencias peptídicas de proteína priónica que se conocen como epítopos de anticuerpos monoclonales que inhiben la formación de priones de enfermedad, en el bucle CD3 de la cadena pesada de un anticuerpo IgG específico de la glucoproteína de la envuelta del VIH-1 (23). Los PrP-IgG resultantes se unían específicamente a las conformaciones de PrP asociadas con la enfermedad pero no con la envoltura del VIH.

60 **Sumario de la invención**

En general, la presente invención se refiere a métodos para obtener anticuerpos insertando una secuencia de aminoácidos, que es capaz de unirse a una diana, en la región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo parental de manera que el anticuerpo así obtenido es capaz de unirse a la diana. Por lo tanto, esta estrategia se puede utilizar para introducir una nueva especificidad de unión en el anticuerpo. Al hacer la inserción

en una de las CDR del anticuerpo parental, CDR H3, la inserción a menudo tiene el efecto de reducir o abolir la unión del anticuerpo parental al antígeno al que se unía inicialmente. Los anticuerpos desvelados en el presente documento son útiles porque son capaces de unirse a una diana, tal como la integrina  $\alpha\beta6$ , mientras que mantienen una o más de las propiedades útiles del anticuerpo parental, tales como interactuar con el sistema inmunitario (por ejemplo, reclutamiento del complemento), una propiedad farmacológica tal como la estabilidad y/o la semivida, por ejemplo, cuando se administra *in vivo* y especialmente cuando se compara con el péptido correspondiente, y/o facilitar la producción en células huésped recombinantes. En la presente divulgación, los anticuerpos parentales se basan en los anticuerpos MFE-23 y las variantes y derivados de los mismos como se expone posteriormente con más detalle.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para modificar un anticuerpo parental en un anticuerpo capaz de unirse a la integrina  $\alpha\beta6$ , en el que el anticuerpo parental comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

- (a) CDR1 de cadena pesada: Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser; y
- (b) CDR2 de cadena pesada: Asp Pro Glu Asn Gly Asp; y
- (c) CDR3 de cadena pesada: (i) Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp, o (ii) Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Phe Asp; y
- (d) CDR1 de cadena ligera: (i) Ser Ser Ser Val Pro, o (ii) Ser Ser Ser Val Ser; y
- (e) CDR2 de cadena ligera: (i) Ser Thr Ser, o (ii) Leu Thr Ser; y
- (f) CDR3 de cadena ligera: Arg Ser Ser Tyr Pro Leu;

y el método comprende la inserción de la secuencia de aminoácidos AVPNLRGDLQVLAQKVA entre los restos de aminoácidos adyacentes Thr98 y Gly99 de la CDR H3 (en la nomenclatura de Kabat) del anticuerpo parental.

En algunos casos, el método comprende además humanizar el anticuerpo o el anticuerpo parental mutando uno o más restos de aminoácido.

En algunos casos, el anticuerpo parental es un scFv o un diacuerpo. En particular el scFv o diacuerpo puede comprender un enlazador que tiene la secuencia  $(Gly_4Ser)_n$  en la que n está entre 1 y 4.

En algunos casos, la inserción reduce la unión del anticuerpo parental al antígeno carcinoembrionario humano (CEA).

En algunos casos, el método comprende además la conjugación del anticuerpo a:

- (i) un resto detectable; y/o
- (ii) un resto terapéuticamente activo; y/o
- (iii) un grupo marcador para su uso en la purificación o detección; y/o
- (iv) uno o más restos citotóxicos, un agente capaz de convertir un profármaco en un resto citotóxico, un radiosensibilizante y/o un átomo radioactivo. En particular, el resto detectable puede detectarse por Formación de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI), Espectroscopia de Resonancia Magnética (MRS), Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único (SPECT), Tomografía de Emisión de Positrones (PET) o formación de imágenes ópticas, y/o puede ser un resto radioactivo;

el resto terapéuticamente activo puede ser un agente anti-cáncer; el grupo marcador puede ser c-Myc o un grupo poli-histidina; y/o el resto citotóxico puede ser un agente quimioterápico o un polipéptido citotóxico, y/o el agente capaz de convertir un profármaco en un resto citotóxico puede ser una enzima para su uso en terapia con profármaco-enzima dirigidos por un anticuerpo (ADEPT).

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora adicionalmente a modo de ejemplo y no de limitación en referencia a las figuras y tablas adjuntas.

## Breve descripción de las figuras

**Figura 1.** Presentación esquemática de la construcción de MFEVP1 y NFEVP1. (A) La inserción del RGD que contiene las secuencias peptídicas de VP1 (A<sub>140</sub> a A<sub>156</sub>) en el bucle CDR3 (entre T98 y G99) de la cadena VH de MFE-23 da lugar al MFEVP1. La mutación Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> de MFEVP1 da lugar al NFEVP1. (B) diagrama en forma de cinta de la estructura por rayos X de MFE-23. Los restos del bucle de CDR3 P<sub>97</sub> a P<sub>100</sub> de la cadena VH de MFE se muestran en una presentación en forma de bastón y el sitio de inserción del péptido en MFE-23 se indica con una flecha. Y<sub>100b</sub> que se mutó a P<sub>100b</sub> para dar lugar a NFEVP1 se muestra en una presentación con forma de bola y bastón.

**Figura 2.** NFEVP1 expresado por *E. coli* separado en formas monomérica y dimérica en una cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75). La proteína de *E. coli* se aplicó después de una cromatografía de afinidad

Ni<sup>2+</sup> y la de *P. Pastoris* después de EMD-IMAC y cromatografía de afinidad Ni<sup>2+</sup>. La SDS-PAGE reductora con un 12 % de Tris-glicina muestra fracciones diméricas (D) y monoméricas (M) de la proteína expresada por *E. coli*.

**Figura 3.** El MFEPV1 mostraba una unión dependiente de la concentración a la  $\alpha\beta 6$  inmovilizada en ELISA y en las células e inhibía la migración celular de células VB6 a lo largo de pocillos revestidos con LAP. (a) se aplicaron MFEVP1 (a distintas concentraciones) y MFE (10  $\mu\text{g/ml}$ ) a la  $\alpha\beta 6$  inmovilizada y a los pocillos con tampón Tris de control. Se detectó la unión con anti-MFE de conejo seguido por un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano rusticano (HRP). (b) Se permitió que el MFE o MFEPV1 se uniera a las células A375P $\beta 6$  y A375Ppuro. La unión de los scFv se detectaron por citometría de flujo con un anticuerpo anti-IgG tetra-His de ratón seguido por anticuerpo anti-Fc de ratón conjugado con Alexa Fluor®. Líneas grises, IgG no inmunitaria; líneas negras, 10D5 (anti- $\alpha\beta 6$ ). El MFEPV1 se señala con líneas rojas (50  $\mu\text{g/ml}$ ), líneas naranjas (5  $\mu\text{g/ml}$ ), líneas verdes (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) y líneas azules (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ). Las concentraciones menores de 50  $\mu\text{g/ml}$  eran omitidas por MFE, y todos los experimentos con A375Ppuro. La unión de MFEPV1 a 50  $\mu\text{g/ml}$  a A375P $\beta 6$  se solapaba con los histogramas de 5  $\mu\text{g/ml}$  y 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y no se muestran. Los datos representan tres experimentos independientes con resultados similares. (c, d) Se permitió que las células VB6 invadieran a través de filtros de policarbonato revestidos de LAP en presencia de las proteínas. Se observó la inhibición de la migración celular por MFEVP1, NFEVP1 (ambos a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) y 10D5 (c) y en una manera dependiente de la concentración para MFEVP1 (d). El control diseñado W632, y los anticuerpos 10D5 se utilizaron a 1:100 y 10  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Los datos representan la media de mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar en cada punto de datos (a, c y d).

**Figura 4.** MFEVP1 y NFEVP1 unidos a la  $\alpha\beta 6$  inmovilizada y no a  $\alpha\beta 3$  por ELISA. A375Ppuro y A375P $\beta 6$  expresaban  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 1$  con niveles similares. La expresión de  $\alpha\beta 6$  solo se detecta en las células A375P $\beta 6$ . (a) La unión de MFEVP1, NFEVP1 y MFE [todos a 20  $\mu\text{g/ml}$ ] se detectó con anticuerpos anti-MFE de conejo seguido por anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano rusticano y, para detectar la inmovilización de integrina, los pocillos se incubaron también con anti- $\alpha v$  de ratón seguido por anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón marcado con HRP. Los datos representan la media de mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar de cada punto de datos. (b) Las células A375Ppuro y A375P $\beta 6$  se incubaron con los anticuerpos. Los controles negativos (histogramas blancos) tenían solo el anticuerpo secundario.

**Figura 5.** El MFEVP1 mostraba una unión residual con el CEA inmovilizado y se unía a las células LS-174T que expresan CEA. La unión a CEA se eliminó por la mutación Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub>. (a) Se añadieron MFEVP1 y NFEVP1 (a tres concentraciones diferentes) a pocillos con CEA y PBS inmovilizados. Se detectó la unión con anti-MFE de conejo seguido por anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP). Los datos representan la media de mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar de cada punto de datos. (b) Se incubaron las células con MFEVP1, NFEVP1 y MFE (todos a 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Se detectó la unión por citometría de flujo con IgG de conejo anti-MFE seguido por anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con R-ficoeritrina (R-PE). El control de omisión es el experimento con MFE sin la IgG de conejo anti-MFE. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. El % de intensidad de fluorescencia regulada ( $7 \times 10^1$ - $10^4$ , como se indica) son valores medios de tres experimentos por separado de los que se han sustraído los valores medios del control.

**Figura 6.** El NFEVP1 (P) se internaliza en las células A375P transfectadas con  $\beta 6$  como se reveló por microscopía confocal de fluorescencia indirecta. Las células A375P transfectadas con  $\beta 6$  y no transfectadas (puro) se incubaron con NFEVP1 durante 1 h a 4 °C, se retiró el scFv y se cambiaron las células a 37 °C las veces que se indican. Se detectó la unión de NFEVP1 a la superficie celular y el internalizado con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón seguido por anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor®546 (rojo). En el experimento de control se omitió el NFEVP1. El azul revela la tinción nuclear con Hoechst.

**Figura 7.** El NFEVP1 y MFE tenían elementos de estructura secundaria y curvas de desnaturalización muy similares como se determinó por espectroscopia FT-IR. (a) El segundo espectro derivado de FT-IR de NFEVP1 y MFE se obtuvo del espectro de absorbancia registrado a 30 °C tras la sustracción del tampón de control. (b) Para la curva de desnaturalización ambas proteínas se calentaron de 25 °C a 85 °C y se midió el espectro de FT-IR. Se obtuvieron los puntos medios de desnaturalización a partir del ajuste de la intensidad del pico a 1635  $\text{cm}^{-1}$  del segundo espectro derivado a una curva sigmoidea resultando en 47 °C para MFE y 45 °C para NFEVP1.

**Figura 8.** El HFEVP1 eluido casi exclusivamente como dímero en la cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75), se unió a una  $\alpha\beta 6$  en ELISA e inhibía la adhesión de células 3T3 $\beta 6.19$  que expresaban  $\alpha\beta 6$  a LAP. (a) El HFEVP1 expresado por *P. Pastoris* se aplicó tras las cromatografías de afinidad Ni<sup>2+</sup> y EBD-IMAC. Se muestra la SDS-PAGE del doce por ciento de Tri-glicina en condiciones reductoras y no reductoras de la fracción dimérica. (b) Se aplicaron NFEVP1, HFEVP1 y MFE a 20  $\mu\text{g/ml}$  a pocillos con  $\alpha\beta 6$  inmovilizada y tampón Tris de control. Se detectó la unión con IgG anti-Tetra-His de ratón seguido por un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón unido a peroxidasa de rábano rusticano (HRP). Los datos representan la media de mediciones por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar de cada punto de datos. (c) Se añadieron células 3T3 $\beta 6.19$  radiomarcadas con [<sup>51</sup>Cr] con varias concentraciones de MFE, NFEVP1, HFEVP1 o

10D5 en placas de 96 pocillos revestidos con 50  $\mu$ l (0,25  $\mu$ g/ml) de LAP. Los datos muestran la media y las desviaciones estándar de grupos de cuatro pocillos.

**Figura 9.** Purificación IMAC de hMFE, hMFE23-RGD y hMFE23-RGE. Transferencia de Western de hMFE (A), hMFE23-RGD (B) y hMFE23-RGE (C) utilizando anti-His4. Se aplicaron las muestras de la siguiente manera: sobrenadante (calle 1), lavado con PBS (calle 2), lavado con 40 mM de imidazol (calle 3), lavado con 200 mM de imidazol (calle 4), lavado con 200 mM de imidazol tras diálisis contra PBS (calle 5) y lavado con EDTA (calle 6).

**Figura 10.** Unión de hMFE, hMFE23-RGD, y hMFE23-RGE a CEA. Se añadieron hMFE, hMFE23-RGD y hMFE23-RGE como sobrenadante completo, con una dilución de 1:10 y con una dilución de 1:100 para hMFE y 2YT al CEA inmovilizado. Se detectó la unión con anti-His4 de ratón y anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con HRP.

**Figura 11.** Detección de la unión de proteínas hMFE, hMFE-RGD y hMFE-RGE marcadas con His al CEA inmovilizado, rs $\alpha$ v $\beta$ 6 o PBS de control. Se revistieron placas de 96 pocillos con 1  $\mu$ g/ml de CEA, 1,5  $\mu$ g/ml de rs $\alpha$ v $\beta$ 6 o PBS, y se bloquearon los sitios de unión no específicos residuales con un 1 % de Tween 20, un 5 % de BSA. Las proteínas purificadas se diluyeron a 1/50, se añadieron a los pocillos, y se les permitió que se unieran durante una hora antes del lavado y se detectaron con TetraHis Qiagen (anti-4xHis de ratón) seguido por anti-ratón conjugado con peroxidasa. La unión a la peroxidasa se visualizaba por el cambio de color de la reacción al añadir el reactivo TMB+ (DAKO), y se cuantificó por la absorbancia a 450 nm después de parar la reacción con IN H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se omitieron el TetraHis y anti-ratón en algunos pocillos de control, como se muestra. Los datos mostrados son los resultados de pocillos por duplicado.

## Descripción detallada

### Anticuerpos

Se desvelan en el presente documento anticuerpos en los que la secuencia peptídica capaz de unirse a una diana, tal como la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 6, se inserta en al menos una región determinante de complementariedad de un anticuerpo parental con el fin de modificar el anticuerpo parental de manera que sea capaz de unirse a la diana, mientras que mantiene otras propiedades útiles del anticuerpo parental, tal como las propiedades del anticuerpo para la interacción con el sistema inmunitario (por ejemplo, el reclutamiento del complemento), estabilidad y semivida cuando se administran *in vivo*, especialmente cuando se comprara con el péptido correspondiente, y facilidad de producción. Se pueden insertar secuencias de unión a múltiples dianas se pueden insertar en diferentes regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo parental. Adicional o alternativamente, además de la secuencia(s) insertada, se puede injertar una secuencia de unión a la diana en una o más regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo parental. La presencia de secuencias de unión a múltiples dianas puede permitir la formación de formas diméricas o multiméricas del anticuerpo. Ejemplos de dianas y las secuencias peptídicas que son capaces de unirse a las mismas se tratan con más detalle posteriormente.

En particular, la presente invención emplea los armazones del anticuerpo MFE-23 y variantes del mismo, como se define en las reivindicaciones, como anticuerpos parentales en los que se insertan los péptidos de direccionamiento. Como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos MFE-23 incluyen los siguientes ejemplos de esta familia como armazones de anticuerpo parental que se pueden utilizar en la presente divulgación. El MFE-23 era originalmente un scFv aislado de una biblioteca de fagos de presentación murinos y se seleccionó por su unión específica al antígeno carcinoembrionario (CEA) (Chester et al., Lancet 343: 455-456, 1994). El MFE-23 se ha humanizado con el fin de reducir la probabilidad de inmunogenicidad (hMFE) y el anticuerpo humanizado se ha madurado en afinidad para producir el scFv sm3E mutante. Se hace referencia a una forma estabilizada humanizada del MFE-23 como shMFE. Los anticuerpos MFE-23, y los derivados de los mismos, se desvelan en el documento WO95/15341 o el documento EP 0733072A y documento US7232888. Los anticuerpos también se han sometido a estudios pre-clínicos, y en algunos casos clínicos, satisfactorios que apoyan su potencial para su uso en terapias del cáncer dirigidas (por ejemplo, radioinmunoterapia, inmunoterapia celular, terapia génica, terapia de citocinas dirigidas) y como un agente formador de imágenes. Estos incluyen los estudios en Fase I del MFE-23 radiomarcado para su uso como un agente formador de imágenes para cirugía radioinmunoguiada y como un resto dirigido al tumor en una terapia con profármaco-enzima dirigidos por un anticuerpo.

Los anticuerpos MFE-23 comprenden las siguientes seis CDR, como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del documento US7232888 (con la excepción de la CDR (d) (ii) desvelada en otro sitio de la patente [y la CDR (e) (i) desvelada en otro sitio de la patente]):

- (a) CDR1 de cadena pesada: Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser;
- (b) CDR2 de cadena pesada: Asp Pro Glu Asn Gly Asp;
- (c) CDR3 de cadena pesada: (i) Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp;
- (d) CDR1 de cadena ligera: (i) Ser Ser Ser Val Pro, o (ii) Ser Ser Ser Val Ser;
- (e) CDR2 de cadena ligera: (i) Ser Thr Ser, o (ii) Leu Thr Ser;
- (f) CDR3 de cadena ligera: Arg Ser Ser Tyr Pro Leu;

En la CDR2 de la cadena ligera, (i) se deriva de la secuencia de la CDR de los anticuerpos MFE-23 murinos y (ii) se deriva de la secuencia de la CDR del MFE-23 humanizado.

- 5 Como los bucles CDR son regiones accesibles para la interacción con los epítomos del antígeno contra el que el anticuerpo parental era específico, se desea en general en la presente divulgación la inserción de secuencias peptídicas dirigidas en estas regiones. Mientras que cualquiera de las CDR de los anticuerpos MFE-23 pueden ser adecuadas, de acuerdo con los métodos de la presente invención, la secuencia peptídica, como se define en las reivindicaciones, se inserta en la región CDR H3 del anticuerpo parental entre los restos Thr98 y Gly99. Estos es  
 10 debido a que los presentes inventores se dieron cuenta de que en los anticuerpos MFE-23 parentales, la CDR H3 es la más larga y la CDR más variable y es esencial para la unión al antígeno. El sitio entre Thr98 y Gly99 se seleccionó porque la secuencia está al final de la estructura de bucle que protruye y por lo tanto significa que el péptido de dirección que se inserta debería estar disponible para unirse a la diana.
- 15 En una realización, el método de la presente invención emplea un anticuerpo que es un scFv o un diacuerpo que comprende un enlazador que tiene la secuencia (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>, en el que n es entre 1 y 4. Un ejemplo preferido de un scFv o diacuerpo que tiene esta estructura general se representa en la Figura 1.

La inserción también se puede combinar con la mutación de uno o más restos de aminoácidos de las CDR o regiones marco conservadas del anticuerpo parental para modificar o mejorar de otra manera las propiedades del anticuerpo parental, por ejemplo, para reducir o eliminar la unión del anticuerpo parental al antígeno contra el que se originó o era capaz inicialmente de la unión específica o para humanizar el anticuerpo o para aumentar la afinidad por la diana. Sin embargo, en otras realizaciones, puede ser útil mantener la especificidad del anticuerpo parental de manera que el anticuerpo de la presente divulgación sea biespecífico. Ejemplos de otros cambios que se hacen en  
 20 la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental incluyen la mutación de G44 por C44 del dominio VH y A100 a C100 del dominio VL para introducir dos restos de cisteína que formen un puente disulfuro estabilizante intermolecular en un diacuerpo e Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> del dominio VH para ayudar a reducir o eliminar cualquier unión residual restante al CEA. Ejemplos adicionales de otros cambios de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo parental incluye mutaciones que mejoran la afinidad, especificidad o estabilidad y métodos para conseguirlo se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, si es necesaria una maduración de afinidad o aumento de la especificidad, los restos de la CDR H3 se podrían variar utilizando mutagénesis por PCR o mutagénesis dirigida al sitio. Además, el resto de las CDR se podrían variar utilizando mutagénesis por PCR, mutagénesis dirigida al sitio o el cultivo en cepas mutantes de bacterias (Hoogenboom, (2005) y las referencias del presente documento). Los genes mutados resultantes se clonarían y expresarían como scFv en bibliotecas de fagos filamentosos. Las bibliotecas se explorarían en cuanto a fagos que presentarían scFv con eficacia de unión y biológica mejorada. Si se necesita un aumento de estabilidad o rendimiento se podría variar el ADN completo utilizando una mutagénesis por PCR, mutagénesis dirigida al sitio o crecimiento en cepas mutantes de bacterias (Hoogenboom, (2005) y las referencias del presente documento). Los genes mutados resultantes se clonarían y se expresarían como bibliotecas de scFv en bacteriófagos filamentosos. Las bibliotecas se explorarían con respecto a fagos que presentarían scFv con niveles de expresión y estabilidad altos. Como se desvela en el presente documento, también puede ser útil reducir la inmunogenicidad. La inmunogenicidad potencial del scFv, por ejemplo el HFEVP1 o la variante de afinidad madurada, se puede dirigir por identificación y modificación de epítomos de células T y los métodos para esto son bien conocidos en la técnica. Esto se basa en el razonamiento de que se necesita una célula T auxiliar con el fin de montar una respuesta de anticuerpo o de alta afinidad de cambio de isotipo y de larga vida [Chester KA, et al (2005)]. La estrategia necesita la  
 45 identificación de péptidos cortos contenidos en la secuencia proteica que tienen la capacidad de unirse al grupo de unión del MHC clase II y estimula una posterior respuesta de células T. Los restos clave de estos péptidos que contribuyen a la formación del epítomo de células T se pueden identificar determinando si las cadenas laterales interactúan con sus bolsillos de unión clave del grupo de unión al MHC clase II o con el receptor de células T (TCR). Las posteriores sustituciones de aminoácidos en estos restos clave pueden inhibir la formación del epítomo de células T reduciendo la afinidad del péptido por el MHC clase II o evitando el reconocimiento del TCR del péptido del complejo MHC. Una estrategia experimental que utiliza un ensayo de proliferación de células T se podría utilizar ya que tiene en cuenta factores que contribuyen a la formación de epítomos, tal como el procesamiento de antígeno y unión al TCR. Se podrían llevar a cabo estudios *in vitro* con péptidos que abarcan toda la secuencia del scFv, por ejemplo, los péptidos 15méricos solapados por 12 aminoácidos. Los péptidos se podrían ensayar en cuanto a la capacidad para estimular las células T en ensayos de proliferación de células T. Normalmente, se utilizarían las células T de donantes sanos que expresen un amplio intervalo de alelos HLA además de las células T obtenidas de cualquiera de los pacientes que demuestren una respuesta inmunitaria contra el scFv. La localización precisa de los restos clave responsables de la activación de las células T se podría determinar por sustitución de restos (habitualmente con alanina) y ensayando los péptidos resultantes en ensayos de proliferación de células T. El análisis *in silico* también se podría utilizar para predecir las sustituciones de aminoácidos que deberían alterar los péptidos que se unen al MHC clase II. En el estadio final, se podría aplicar el modelado *in silico* para predecir las sustituciones de aminoácidos probables que eliminen la reactividad inmunitaria contra el scFv sin alterar la estructura del scFv o la pérdida de la función del scFv. El gen para la variante preferida se puede fabricar por tecnología de ADN recombinante.

65 En la presente divulgación, "anticuerpo MFE-23" incluye anticuerpos que comprenden las CDR del scFv MFE-23,

fragmentos o derivados de los mismos. También incluye las CDR cuando se incorporan en otra región marco conservada de anticuerpo como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, para producir una estructura de anticuerpo completa, un diacuerpo u otro anticuerpo. Estos incluyen fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno tal como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos. Es posible utilizar anticuerpos monoclonales y otros y utilizar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que mantengan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de un ADN que codifique la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo respecto a las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones marco conservadas, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2.188.638 A o EP 0 239 400 A.

Los anticuerpos se pueden modificar de varias maneras y el término "anticuerpo" debería considerarse como que cubre cualquier miembro de unión específica o sustancia que tiene un dominio de anticuerpo de unión al antígeno con la especificidad necesaria. Por lo tanto, este término cubre los fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión de inmunoglobulina, tanto natural como completa o parcialmente sintético. Por lo tanto están incluidas moléculas quiméricas que comprenden un dominio de inmunoglobulina de unión, o equivalentes, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos están descritos en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo puede llevar a cabo la función de unión a antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo simple; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al, Science, 242; 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85: 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento WO93/11161) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión genética (documento WO 94/13804; Holliger et al, P.N.A.S. USA, 90: 6444-6448, 1993). Las moléculas Fv, scFv o diacuerpos se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter et al, Nature Biotech, 14: 1239-1245, 1996). También se pueden fabricar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al, Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996).

En términos de utilidad de estos anticuerpos, es primariamente terapéutica siendo el diagnóstico/formación de imágenes una utilidad secundaria. En términos de su uso terapéutico, los anticuerpos tienen ventajas sobre los péptidos, como se aprecia en general en la técnica, los péptidos tienden a tener una semivida sérica corta *in vivo*. Por el contrario, los anticuerpos terapéuticos tienden a poseer una mayor estabilidad y una semivida más larga. Ventajas adicionales de los anticuerpos preferidos de la presente divulgación incluyen la combinación de propiedades de unión con alta afinidad de los péptidos de unión a  $\alpha\upsilon\beta 6$  junto con las ventajas del armazón del anticuerpo MFE, a saber la estabilidad, buenos rendimientos de producción, por ejemplo, en *Pichia pastoris*, y para las versiones humanizadas del armazón de anticuerpo MFE, con previsión de un bajo potencial inmunogénico.

#### *Péptidos direccionados*

La presente divulgación implica la inserción de secuencias de aminoácidos a los que se hace referencia en general en el presente documento como "péptidos direccionados" que son capaces de unirse a una diana. De acuerdo con la presente invención, el péptido direccionado tiene la secuencia de aminoácidos AVPNLRGDLQVLAQKVA.

Como se desvela en el presente documento, las secuencias de aminoácidos insertadas capaces de unirse a la diana tienen entre 8, 10 o 12 aminoácidos y 24 o 30 aminoácidos de longitud, y más preferentemente tienen entre 12 y 20 aminoácidos de longitud. La diana puede ser un antígeno presente en células enfermas, a las que los anticuerpos de la presente divulgación son capaces de unirse utilizando el péptido direccionado. A modo de ilustración, las células enfermas pueden tener un antígeno en la superficie, por ejemplo, células cancerosas. El péptido direccionado puede ser capaz de unirse a una integrina tal como la integrina  $\alpha\upsilon\beta 6$  que se sabe que está implicada en procesos normales y patológicos tales como la cicatrización de heridas, la inflamación y el crecimiento tumoral y metástasis.

Más generalmente, las dianas de los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser dianas que (i) se sobre-expresan o se expresan *de novo* en células enfermas (y más específicamente en células cancerosas) y/o (ii) se expresan en células enfermas y median la enfermedad (y más específicamente el cáncer). Por lo tanto, la presente divulgación incluye anticuerpos que se pueden utilizar como anticuerpos que se dirigen al tumor, en los que la diana se sobre- expresa o se expresa *de novo* en una célula enferma, y/o anticuerpos moduladores de función, por ejemplo, en los que la diana se expresa en la célula enferma y el anticuerpo modula la actividad de la diana y/o se dirige a la capacidad para interactuar con sus parejas de unión. Además de la integrina  $\alpha\upsilon\beta 6$ , algunos ejemplos específicos incluyen antígenos asociados al tumor y/o antígenos implicados en una enfermedad mediada tales como MUC1, 5T4, VEGFR (Hofmeister V et al., 2007), Tie2, endoglin (CD105) (Hofmeister V et al., 2007; Munoz R et al.,

2007), receptor uPA (uPAR) (Li Y et al., 2007), PSMA (Baccala A et al., 2007, Buhler P et al., 2007)<sup>4,5</sup>, y miembros de la familia ErbB (Her) (Johnston JB et al., 2006).

5 Se pueden identificar dianas adicionales utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Estas pueden incluir las siguientes estrategias.

10 En una estrategia, los péptidos preferidos incluirían epítomos de la proteína de unión al antígeno que se localizan en bucles expuestos en la superficie, utilizando la estructura tridimensional de la proteína de unión al antígeno. Por ejemplo, en el diseño de las construcciones MFE/shMFE/VP1 los inventores utilizaron el conocimiento de que 17 mero del péptido VP1 es parte de un bucle largo altamente móvil que forma una unidad auto-contenida en la proteína VP1 de FMDV (Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., (1993) Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus Nature 362:566-568). Una característica general es que los restos del ligando que se une a  $\alpha\beta 6$  son parte de un bucle expuesto en la superficie. En la fibronectina también, que es un ligando adicional para  $\alpha\beta 6$ , el motivo de unión RGD es parte de un bucle altamente móvil, que protruye del resto del décimo módulo tipo III (Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J., y Campbell, I. D. (1992) The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: An insight into RGD-mediated interactions Cell 71:671-678).

20 En una segunda estrategia, los péptidos preferidos se podrían diseñar racionalmente utilizando estructuras tridimensionales del complejo antígeno-ligando si están disponibles. En este caso los restos de ligando que están implicados en la unión del antígeno de superficie celular se conocen por el detalle de la interacción ligando-antígeno.

25 En una tercera estrategia, los péptidos preferidos podrían ser los que son potentes en la inhibición de las interacciones antígeno/antígeno-proteína de unión como se muestra *in vitro* en ensayos ELISA o basados en células. Por ejemplo, un 17mero peptídico que contenga la secuencia peptídica 17mérica VP1 menos la alanina del extremo N y un 20mero peptídico que contiene la secuencia peptídica 17mérica utilizada para crear el MFEVP1 eran inhibidores potentes de la unión de FMDV a la  $\alpha\beta 6$  purificada y a las células que expresan  $\alpha\beta 6$  (Burman, A., Clark, S., Abrescia, N. G., Fry, E. E., Stuart, D. I., y Jackson, T. (2006) Specificity of the VP1 GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus for  $\alpha\beta$  Integrins J. Virol. 80:9798-9810) y de las células de fibroblastos transfectadas con  $\beta 6$  a LAP (Dicara, D., Rapisarda, C., Sutcliffe, J. L., Violette, S. M., Weinreb, P. H., Hart, I. R., Howard, M. J., y Marshall, J. F. (2007) Structure-function analysis of Arg-Gly-Asp helix motifs in alpha v beta 6 integrin ligands J. Biol. Chem 282:9657-9665), respectivamente.

35 En una cuarta estrategia, los péptidos preferidos podrían ser los que se seleccionan *in vitro* o *in vivo* de entre bibliotecas de péptidos que se presentan en bacteriófagos filamentosos. Este método se ha utilizado para obtener péptidos con alta afinidad y especificidad por las dianas tumorales (Landon, L.A., Deutscher, S.L. (2003) Combinatorial Discovery of Tumor Targeting Peptides Using Phage Display. J Cell Biochem. 90:509-517). Las bibliotecas peptídicas consisten en secuencias peptídicas lineales o cíclicas aleatorias. La selección *in vitro* se lleva a cabo utilizando proteínas recombinantes purificadas o células que expresan la proteína diana.

40 Por ejemplo, la secuencia peptídica 17-mérica del péptido VP1 insertada en el MFE-23 para crear el MFEVP1 contiene la secuencia DLXXL, que tiene especificidad por  $\alpha\beta 6$ , y también se ha identificado a partir de la exploración de bibliotecas peptídicas 12-méricas presentadas en fago utilizando el receptor soluble truncado transmembrana recombinante. (Kraft, S., Diefenbach, B., Mehta, R., Jonczyk, A., Luckenbach, G. A., y Goodman, S. L. (1999) Definition of an Unexpected Ligand Recognition Motif for  $\alpha\beta 6$  Integrin J. Biol. Chem. 274:1979-1985).

50 En otro ejemplo, una biblioteca de fagos aleatorios que consiste en péptidos lineales de 12 aminoácidos identificaba péptidos que se unen específicamente al antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), un candidato atractivo para la terapia dirigida para el tumor prostático y otros tumores sólidos (Aggarwal, S., Singh, P., Topaloglu, O., Isaacs, J.T., Denmeade, S.R. (2006) A Dimeric Peptide That Binds Selectively to Prostate-Specific Membrane Antigen and Inhibits its Enzymatic Activity Cancer Res. 66:9171-9177). Se exploró una biblioteca peptídica heptamérica restringida a disulfuro presentada en pIII con PSMA extracelular purificado para identificar los péptidos de unión a PMSA.

55 En otro ejemplo, se ha utilizado el receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor tirosina cinasa tipo II (ErbB-2) que muestra ser una promesa en aumento como diana para el diagnóstico y terapia del cáncer como cebo. En este caso, se seleccionó una biblioteca de bacteriófagos de presentación con péptidos aleatorios de 6 aminoácidos contra el dominio extracelular de ErbB-2 purificado para identificar las secuencias de unión al péptido (Karasseva, N.G., Glinsky, V.V., Chen, N.X., Komatireddy, R., Quinn, T.P. (2002) Identification and Characterization of Peptides that Bind Human ErbB-2 Selected from a Bacteriophage Display Library J. Protein Chem. 21:287-296).

60 Las secuencias peptídicas se pueden seleccionar también por presentación de bibliotecas peptídicas en fagos que se unen a antígenos de carbohidrato, que muestran diferentes composiciones en transformaciones malignas. Por ejemplo, se empleó una presentación de fagos *in vitro* para encontrar péptidos que se unieran al antígeno asociado al tumor de Thomsen-Friedenreich (TF) (Peletskaya, E.N., Glinsky, V.V., Glinsky, G.V., et al. (1997) Characterisation of peptides that bind the tumour-associated Thomson-Friedenreich antigen selected from bacteriophage display

libraries J. Mol. Biol. 270:374-384).

Se utilizó una selección de biblioteca peptídica en células para identificar una secuencia peptídica adicional de unión a  $\alpha\beta 6$ . En una biblioteca peptídica 20-mérica fusionada con la proteína pIII de revestimiento de bacteriófago se seleccionaba un péptido que se unía específicamente a una línea celular de adenocarcinoma de pulmón y se demostró posteriormente que se unía a  $\alpha\beta 6$  (Elayadi, A.N., Samli, K.N., Prudkin, L., Liu, Y.-H., Bian, A., Xie, X.-J., Wistuba, I.I., Roth, J.A., McGuire, M.J., Brown, K.C. (2007) A Peptide Selected by Biopanning Identifies the Integrin  $\alpha\beta 6$  as a Prognostic Biomarker for Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 67:5889-5895).

- 10 Los péptidos que se unen a un tumor y el sistema vascular asociado al tumor, también se han seleccionado satisfactoriamente a partir de bibliotecas peptídicas de fagos *in vivo* (Landon, L.A., Deutscher, S.L. (2003) Combinatorial Discovery of Tumor Targeting Peptides Using Phage Display. *J Cell Biochem.* 90:509-517). Esta estrategia permite el direccionamiento de nuevos antígenos además de dianas conocidas. Utilizando como diana el modelo de ratón RIP-1-Tag2 de tumorigénesis multiestadio que implica a los islotes pancreáticos de Langerhans, se permitió la identificación de varios péptidos que discriminaban entre el sistema vascular de los islotes angiogénicos premalignos y los tumores completamente desarrollados (Joyce, J.A., Laakkonen, P., Bernasconi, M., Bergers, G., Ruoslahti, E., Hanahan, D. (2003) Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis *Cancer Cell* 4:309-403). Un estudio similar aislaba péptidos selectivos de progenitores angiogénicos y tumores sólidos de la piel de un modelo de ratón transgénico que implicaba al oncogén tipo 16 del papilomavirus humano (Hoffman, J.A., Giraud, E., Singh, M., Zhang, L., Inoue, M., Porkka, K., Hanahan, D., Ruoslahti, E. (2003) Progressive vascular changes in a transgenic mouse model of squamous cell carcinoma *Cancer Cell* 4:383-391). Los péptidos específicos del sistema vascular humano y tejido humano se han derivado de la selección a partir de una biblioteca peptídica de fagos en un tejido humano trasplantado en un ratón SCID (George, A.J.T., Lee, L., Pitzalis, C. (2003) Isolating ligands specific for human vasculature using *in vivo* phage selection *Trends Biotech.* 21:199-203).

A modo de ejemplo, los péptidos dirigidos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente divulgación incluyen los desvelados en la aplicación anterior de los inventores, documento WO2007/039728. Estos péptidos incluyen péptidos que comprenden el motivo de secuencia de aminoácidos  $\text{RGDLX}^5\text{X}^6\text{X}^7$ , en la que  $\text{X}^5$ ,  $\text{X}^6$  y  $\text{X}^7$  representan independientemente cualquier resto de aminoácido, y preferentemente se seleccionan independientemente de entre Glu, Ala, Leu, Met, Gln, Lys, Arg, Val, Ile, Trp, Phe, Asp, His y Thr. Mientras que los péptidos desvelados en el documento WO2007/039728, comprenden en general una estructura alfa helicoidal inducida por los aminoácidos siguientes a la secuencia RGD, esto no es necesario para los péptidos de la presente divulgación, en particular cuando se insertan en la CDR de un anticuerpo parental y por lo tanto pueden no ser capaces de adoptar esta característica estructural secundaria.

Ejemplos preferidos de péptidos capaces de unirse a la integrina  $\alpha\beta 6$  incluyen los péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos representados por la siguiente fórmula general, basada en los péptidos desvelados en el documento WO2007/039728:

40 ...  $\text{RGDLX}^5\text{X}^6\text{X}^7$ .

en la que

- 45  $\text{X}^5$  se selecciona de entre Glu, Ala o Gln;  
 $\text{X}^6$  se selecciona de entre His, Val, Thr o Glu;  
 $\text{X}^7$  se selecciona de entre Leu o Ile.

Esta secuencia peptídica anterior puede ser parte de secuencias más largas, por ejemplo, que tengan uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez o más aminoácidos adicionales unidos al extremo N o C del péptido, mientras que opcionalmente conforman los intervalos de longitudes preferidos de la secuencia peptídica expuesta anteriormente. La secuencia de péptido dirigido que se emplea en la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos AVPNLRGDLQVLAQKVA.

55 Los péptidos pueden comprender una "estructura alfa helicoidal" como se desvela en el documento WO2007/039728, que es un grupo secuencial de aminoácidos en un péptido que interactúa con un patrón de enlaces hidrógeno particular y por lo tanto define una estructura helicoidal. Por ejemplo, el patrón de enlaces de hidrógeno en una hélice alfa convencional está entre el oxígeno carbonilo del resto n y el hidrógeno amida del resto n+4. Para la hélice  $3_{10}$ , este patrón de enlaces de hidrógeno es entre los restos n y n+3 y para la hélice pi es entre los restos n y n+5. El número de restos en cada hélice alfa a su vez es de 3,6, 3,0 y 4,4 para la hélice alfa convencional, hélice  $3_{10}$ , y hélice pi, respectivamente, véase por ejemplo, el documento WO95/00534.

*Variantes y usos de los anticuerpos*

65 El método de la presente invención puede comprender además la conjugación del anticuerpo con un resto detectable. La expresión "resto detectable" se refiere a un grupo que, cuando se localiza en el sitio diana después de

la administración de los anticuerpos a un paciente, se pueden detectar, normalmente de forma no invasiva desde fuera del cuerpo y se localiza el sitio de la diana. Por lo tanto, los anticuerpos desvelados en el presente documento son útiles para la creación de imágenes y el diagnóstico. Los restos detectables son entidades que se detectan por técnicas de imagen tales como la creación de imágenes por resonancia magnética (MRI), Espectroscopia por Resonancia Magnética (MRS), Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (SPECT) y Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y formación de imágenes ópticas. Preferentemente, los restos de creación de imágenes son entidades estables, no tóxicas que mantienen sus propiedades en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Ejemplos de dichos restos incluyen pero no se limitan a restos radioactivos, por ejemplo isótopos radioactivos. Los átomos radioactivos adecuados incluyen tecnecio- 99m o yodo-123 para los estudios gammagráficos. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcadores de espín para MRI tales como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, fluoro-18, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro y restos ópticos que incluyen Cy5.5 y puntos cuánticos.

Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden conjugar o unir con un resto terapéuticamente activo, por ejemplo un resto que sea citotóxico.

Una clase adicional de grupos que se pueden incorporar en los anticuerpos de la presente divulgación son marcadores de afinidad que se pueden introducir en los anticuerpos para hacer posible que se manipulen o detecten en una o más etapas. Se conoce un amplio intervalo de marcadores de afinidad en la técnica. Los marcadores de afinidad adecuados incluyen miembros de parejas de unión específicas, anticuerpos y antígenos, biotina que se une a estreptavidina y avidina, polihistidina (por ejemplo, marcadores hexa-His o tri-His) o amino di o tricarboxilatos que se unen a iones metálicos tales como el Ni<sup>2+</sup> o Co<sup>2+</sup>, epítopos Flag o Glu que se unen a anticuerpos anti-Flag, marcadores S que se unen a estreptavidina, péptido de unión a la calmodulina que se une a la calmodulina en presencia de Ca<sup>2+</sup>; ribonucleasa S que se une a aporribonucleasa S; y c-Myc que reconoce el anticuerpo anti-c-Myc. Ejemplos de otros marcadores de afinidad que se pueden utilizar de acuerdo con la presente divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica. Los anticuerpos que incluyen estos marcadores de afinidad pueden purificarse y manipularse fácilmente.

La expresión "resto terapéuticamente activo" engloba un resto que tiene propiedades beneficiosas, profilácticas y/o terapéuticas.

En una realización el resto terapéuticamente activo es un agente quimioterápico citotóxico. Los agentes quimioterápicos citotóxicos se conocen bien en la técnica e incluyen agentes anti-cáncer tales como:

Agentes alquilantes que incluyen las mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucilo; 10 etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina, tiotepa; alquil sulfonatos tales como busulfan; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNLJ), semustina (metil-CCN-U) y estreptozocina (estreptozotocina); y triazenos tales como dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida); antimetabolitos que incluyen análogos del ácido fólico tales como metotrexato (ametopterina); análogos de las pirimidinas tales como fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) y citarabina (arabinósido de citosina); y análogos de purina e inhibidores relacionados tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina, TG) y pentostatina (2-desoxicofonina). Productos naturales que incluyen los alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como dactinomomicina (actinomomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C); enzimas tales como la L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como alfenomas de interferón. Los agentes misceláneos incluyen complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino; antracenedionas tales como mitoxantrona y antbraciclina; urea sustituida tal como hidroxurea; derivados de la metilhidrazina tales como la procarbacin (N-metilhidazina, MIH); y supresores adrenocorticales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; taxol y derivados/análogos; y antagonistas/agonistas hormonales tales como flutamida y tamoxifeno.

Los métodos de conjugación de anticuerpos con agentes terapéuticos se conocen bien en la técnica.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden formular utilizando sistemas de suministro basados en partículas tales como nanopartículas y vesículas con base lipídica tales como liposomas u otras estructuras similares compuestas de lípidos. Los liposomas son vesículas esféricas que comprenden una bicapa de fosfolípidos que se pueden utilizar como agentes para suministrar materiales tales como fármacos o material genético. Los liposomas pueden estar compuestos de fosfolípidos de origen natural con cadenas lipídicas mixtas (fosfatidiletanolamina de huevo) o de componentes puros como el DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina). La síntesis y uso de los liposomas está bien establecido ya en la técnica. Los liposomas se crean en general por sonicación de fosfolípidos en un medio adecuado tal como el agua. Las tasas de baja cizalladura crean liposomas multilaminares que tienen estructuras multi-capa. La sonicación continua de alta cizalladura tiende a formar liposomas unilaminares más pequeños. La investigación también ha sido capaz de hacer posible que los liposomas eviten la detección por el sistema inmunitario, por ejemplo, revistiendo los liposomas con polietilenglicol (PEG). También es posible incorporar especies en los liposomas, tales como los péptidos de la divulgación para ayudar a

dirigirlos a un sitio de suministro, por ejemplo en células o *in vivo*.

El uso de nanopartículas como agentes de suministro para materiales asociados con o unidos a las nanopartículas se conoce en la técnica. Algunos tipos de nanopartículas comprenden un núcleo, a menudo de metal y/o átomos semiconductores, a los que se pueden unir ligandos de uno o más tipos diferentes, incluyendo, por ejemplo, uno o más de los péptidos de la presente divulgación, véase por ejemplo, los documentos WO02/32404, WO2005/10816 y WO2005/116226. Otros tipos de nanopartículas se pueden formar a partir de materiales tales como los liposomas. En algunos casos, las nanopartículas que se pueden derivar o conjugar con otros ligandos pueden estar presentes para proporcionar nanopartículas con diferentes propiedades o funciones. En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden ser puntos cuánticos, que son nanocristales de materiales semiconductores que tienen propiedades químicas y físicas sorprendentes que se diferencian notablemente de las del sólido en bruto (véase Gleiter, Adv. Mater. 1992, 4, 474-481). Ahora que se entienden sus efectos de tamaño cuántico, se ha vuelto cada vez más popular la investigación fundamental y aplicada de estos sistemas. Una aplicación interesante es el uso de nanocristales como marcadores luminiscentes para sistemas biológicos, véase por ejemplo, Brucher et al, Science 1998, 281, 2013-2016, Chan y Nie, Science, 1998, 281, 2016-2018, Mattousi et al, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 12142-12150, y Alivisatos, Pure Appl. Chem. 2000, 72, 3-9. Los puntos cuánticos tienen varias ventajas sobre los colorantes fluorescentes convencionales: los puntos cuánticos emiten luz en varias longitudes de onda precisas dependiendo de su tamaño y tienen vidas luminiscentes largas.

En una realización adicional, el resto citotóxico es un resto de péptido o polipéptido citotóxico en el cual los inventores incluyen cualquier resto que da lugar a la muerte celular.

Los restos de péptido o polipéptido citotóxicos se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, ricino, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, RNasa, factor tisular y similares.

El uso del ricino como agente citotóxico se describe en Burrows y Thorpe, P.N.A.S. USA 90: 8996-9000, 1993, y el uso del factor tisular, que da lugar a la coagulación localizada de la sangre y el infarto de un tumor, se ha descrito por Ran et al., Cancer Res. 58: 4646-4653, 1998 y Huang et al., Science 275: 25 547-550, 1997. Tsai et al., Dis. Colon Rectum 38: 1067- 1074, 1995 describe la cadena abrina A conjugada con un anticuerpo monoclonal. Otras proteínas inactivadoras del ribosoma se describen como agentes citotóxicos en el documento WO 96/06641. La exotoxina de *Pseudomonas* se puede utilizar también como el resto de polipéptido citotóxico (véase, por ejemplo Aiello et al, P.N.A.S. USA 92: 10457-10461, 1995).

Ciertas citocinas, tales como el TNF $\alpha$  e IL-2, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos y/o terapéuticos.

Ciertos átomos radioactivos también pueden ser citotóxicos si se suministran en dosis suficientes. Por lo tanto, el resto citotóxico pueden comprender un átomo radioactivo, que al usarse, suministra una cantidad de radioactividad suficiente al sitio diana de manera que sea tóxico. Los átomos radioactivos adecuados incluyen fósforo-32, yodo-125, yodo-131, indio-111, renio-186, renio-188 o itrio-90, o cualquier otro isótopo que emita suficiente energía para destruir células vecinas, orgánulos o ácido nucleico. Preferentemente, los isótopos y la densidad de los átomos radioactivos del anticuerpo de la divulgación son de tal manera que se suministre una dosis de más de 4000 cGy, y más preferentemente al menos 6000, 8000 o 10000 cGy, en el sitio diana y, preferentemente, a las células del sitio diana y sus orgánulos, particularmente el núcleo.

El átomo radioactivo se puede unir al resto de unión de alguna de las maneras conocidas. Por ejemplo, se puede unir EDTA u otro agente quelante al resto de unión y usarlo para unir  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$ . Los restos de tirosina se pueden marcar con  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$ .

La presente divulgación proporciona un polipéptido unido a una proteína de la envoltura de un virus distinto al FMDV para cambiar el tropismo del virus para suministrar el ADN que codifica genes terapéuticos.

De manera alternativa, cualquiera de estos sistemas se puede incorporar en un sistema de profármaco. Dichos sistemas de profármaco se conocen bien en la técnica e incluyen los sistemas ADEPT en los que un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se conjuga o se puede conjugar o fusionar con un agente capaz de convertir un profármaco a un resto citotóxico que es una enzima para su uso en terapia con profármaco-enzima dirigidos por anticuerpo.

También se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un péptido y/o un ácido nucleico y/o un vector de expresión como se ha definido anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye en general componentes que son compatibles con el péptido, ácido nucleico o vector y que no son perjudiciales para los receptores del mismo. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que serán estériles y libres de pirógenos. Sin embargo, se pueden utilizar otros vehículos aceptables. Normalmente, las composiciones o formulaciones farmacéuticas de la divulgación son para la administración parenteral, más particularmente para administración intravenosa.

También se desvelan en el presente documento el uso de un anticuerpo como se describe en el presente

documento, o el ácido nucleico que codifica el anticuerpo o un vector que comprende el ácido nucleico, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección que se caracteriza por células enfermas que expresan la diana, por ejemplo, una afección en la que las células sobre-expresan la diana y/o presentan la diana en la superficie celular y/o que es una enfermedad mediada por la diana.

5 Se proporcionan posteriormente ejemplos de dichas afecciones que incluyen el cáncer, por ejemplo, haciendo uso de los antígenos expresados en la superficie de las células cancerosas. Las afecciones pueden incluir enfermedades mediadas por  $\alpha\beta 6$  o enfermedades en las que las células sobre-expresan  $\alpha\beta 6$ , tales como el cáncer, fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema pulmonar o enfermedad cutánea ulcerosa crónica, tal como la epidermolisis bullosa. Como se ha mencionado en el presente documento, estas afecciones incluyen el tratamiento de cicatrización de heridas y la inflamación.

15 El medicamento o composición farmacéutica de la presente divulgación como se ha definido anteriormente puede administrarse de manera útil a un paciente al que también se administran otros medicamentos, como conocen bien los expertos en la técnica. Por ejemplo, en el caso del cáncer, el medicamento o composición farmacéutica de la presente divulgación se puede administrar a un paciente antes, después o durante la administración de otros agentes anti-tumorales, por ejemplo, antes, después o durante la quimioterapia. El tratamiento con el anticuerpo tras la quimioterapia puede ser particularmente útil en la reducción y prevención de la recaída del tumor o la metástasis. Por ejemplo, el agente antitumoral se puede unir covalentemente directa o indirectamente (mediante liposomas/nanopartículas) a un anticuerpo de la presente divulgación.

25 También se desvela en el presente documento un método de creación de imágenes de células epiteliales que sobre-expresan  $\alpha\beta 6$  en el cuerpo de un individuo, comprendiendo el método la administración al individuo de una cantidad eficaz de un anticuerpo como se define en el presente documento. El método es particularmente útil para la creación de imágenes de fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema pulmonar, enfermedad cutánea ulcerosa crónica (por ejemplo, epidermolisis bullosa) o tumores de células epiteliales. Por ejemplo, el método de creación de imágenes puede incluir la unión del anticuerpo dirigido a una sonda fluorescente e incorporarlo en un enjuague bucal, chicle, pulverizador u otros elementos de manera que se pueda visualizar el conjugado anticuerpo-sonda por su marcador fluorescente.

30

### Ejemplos

35 Los ejemplos experimentales que se exponen posteriormente demuestran que la especificidad de un anticuerpo parental se puede modificar insertando una secuencia peptídica de unión a  $\alpha\beta 6$  en la CDR del anticuerpo parental. En los ejemplos, el anticuerpo parental es un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv), que consiste en las regiones variable de cadena pesada y variable de cadena ligera unidas por un enlazador flexible que mantiene las propiedades de unión del anticuerpo completo. A modo de ejemplo, el scFv se puede basar en un scFv MFE-23, un scFv desarrollado por tecnología de fagos que se una con alta afinidad al antígeno carcinoembrionario, CEA (14). El CEA es un marcador selectivo tumoral que se expresa altamente en la mayoría de los carcinomas gastrointestinales y en varios carcinomas de mama, pulmón y ovario. El MFE yodado se ha utilizado en pacientes para la creación de imágenes (15) y cirugía radioinmunoguiada en cáncer colorrectal (16). El MFE también ha demostrado ser prometedor para la terapia del cáncer cuando se utiliza como una proteína de fusión con la carboxipeptidasa G2 en una terapia con profármaco-enzima dirigidos por anticuerpo (ADEPT) (17); (18).

45 Como se desvela en el presente documento, se produjo racionalmente un scFv contra  $\alpha\beta 6$  por modificación de anticuerpo insertando motivos de unión peptídica de ligandos del péptido  $\alpha\beta 6$  conocidos, tales como las proteínas VP1, en la región de bucle del MFE. La tercera región determinante de complementariedad (CDR3) de la cadena pesada variable (VH) del MFE proporciona el sitio principal de la interacción con CEA, como se evaluó por mutagénesis, y en consecuencia se escogió como el sitio preferido para dicha inserción.

50

55 En los experimentos expuestos posteriormente, se describe la inserción de un péptido de unión a  $\alpha\beta 6$  de VP1 a partir de la cepa O<sub>1</sub> BFS de FMDV en el bucle CDR3 del dominio VH de MFE. Se había demostrado previamente que un péptido 17-mérico y un péptido 20-mérico que se correspondían con esta región de VP1 eran potentes inhibidores de la unión de FMDV a la  $\alpha\beta 6$  purificado y a las células que expresaban  $\alpha\beta 6$  (24) y de las células fibroblásticas transfectadas con  $\beta 6$  a LAP (25), respectivamente. La adición de un péptido 17-mérico de VP1, equivalente en secuencia a los péptidos inhibidores, al MFE cambiaba la especificidad de unión del scFv del CEA a  $\alpha\beta 6$  como se demostraba por ELISA, unión celular e inhibición en un ensayo de migración. La mutación adicional de Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> del dominio VH como en NFEVP1 eliminaba toda unión residual restante con el CEA.

### 60 Materiales y métodos

#### *Visualización 3D de proteínas*

65 La estructura por rayos X del MFE (pdb, código 1QOK) (26) se visualizó en un Insight II (Accelrys) en una unidad de trabajo de Silicon Graphics.

*Anticuerpos*

Se adquirieron anticuerpos monoclonales murinos contra  $\alpha\beta 3$  (LM609),  $\alpha\beta 6$  (10D5) y  $\alpha\beta 1$  (P1D6) en Chemicon International, Harrow, RU mientras que los contra  $\alpha\beta 5$  (P1F6) y  $\alpha\beta 8$  (14E5) fue un regalo generoso de los Dr. Dean Sheppard y Steve Nishimura (UCSF), respectivamente. El anticuerpo secundario fue un antisuero de conejo anti-ratón conjugado con Alexafluor-488 (Molecular Probes) a menos de que se establezca otra cosa.

*Construcción de plásmidos para la expresión en E. coli*

*Construcción de los plásmidos de MFE-RGD y MFE-RGE, MFE-RGD/pUC119 y MFE-RGE/pUC119*

Se construyeron el MFE-RGD y MFE23-RGE por mutagénesis dirigida al sitio utilizando los cebadores de MFE-RGD directo (5'\_CTACTGCAACGAAGGGACAGCTAGAGGTGATTTGGCTACTTTGTTCCGACTACTGGGGAC AAG\_3') y de MFE-RGD inverso (5'\_CTTGTCCCCAGTAGTTCGAACAAAGTAGCCAAATCACCTCTAGCTGTCCCTTCGTTGCA GTAG\_3') o de MFE23-RGE directo (5'\_GAAGGGACAGTAGAGGTGAATTGGCTACTTTGTTCCGAC TACTG\_3') y de MFE23-RGE inverso (5'\_CAGTAGTCGAACAAAGTAGCCAATTCACCTCTAGCTGTCCCTTC\_3'), respectivamente. Las reacciones de PCR utilizaron el plásmido phMFEhis\_119 como matriz, que incorporaba la forma humanizada de MFE-23 (hMFE) y un marcador 6xHis en el extremo C para facilitar la purificación mediante Cromatografía de Afinidad de Ion Metálico Inmovilizado (IMAC).

*Construcción del plásmido de MFE y de la variante del bucle CDR3 de VH de HFE MFE, MFEVP1/pUC119 y HFEVP1/pUC119*

El MFEVP1 y HFEVP1, que contienen las secuencias de MFE y HFE respectivamente, y un péptido de unión 17-  
mérico a  $\alpha\beta 6$  de VP1 en el bucle CRD3 de la cadena pesada (Figura 1), se construyeron mediante tres reacciones  
PCR. En primer lugar, se construyeron con los cebadores en sentido de la VH de MFEVP1 (5'  
CATG**CCATGG**CCCAGGTGAAACTG) o la VH HFEVP1 (5' CATG**CCATGG**CCCAAGTTAAACTGGAACAGTCC) y  
los cebadores antisentido del MFEVP1 (5'GCGCCAGCACCTGCAGATCACCTCGCAGATTCGGAACTGCAGTCCG  
AGTCCCCTCATTAC) o HFEVP1 (5'GAGCCAGCACCTGCAGATCACCTCGCAGATTCGGAACTGCAGTTGGTGT  
CCTTCGTTGC), respectivamente, que contenían parte de péptidos adicionales del motivo de unión a la  $\alpha\beta 6$  de  
VP1 (que se muestran subrayados en los cebadores). En segundo lugar se construyeron los extremos 3' con los  
cebadores antisentido de la VL de MFEVP1 (5' ATAGTTTAGCGGCCGCCCCGTTTCAGCTC) o la VL HFEVP1 (5'  
ATAGTTTAGCGGCCGCAGCCTTGATTTTC) y los cebadores en sentido de MFEVP1 (5'CTGCGAGGTGATCTGCA  
GGTCTGGCGCAGAAAGTTGCAGGGCCGTACTACTTTGACTACTG) o del HFEVP1 (5'CTGCGAGGTGATCTGC  
AGGTCTGGCTCAGAAAGTTGCAGGT**CCT**TACCCTTTTCGACTACTGGGGACAAGG), respectivamente que  
contienen parte del motivo de unión  $\alpha\beta 6$  adicional y en el caso del HFEVP1 también se introducía la mutación de  
Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> (mostrada en negrita y subrayada en el cebador; la numeración de aminoácidos se da con la  
nomenclatura de Kabat). Las reacciones PCR para el MFEVP1 utiliza el plásmido VFE/puc119 como matriz y los del  
HFEVP1 el plásmido HFE/pCTCON (27) como matriz. En tercer lugar, los productos de la PCR de las dos primeras  
reacciones se utilizaron como matrices y se amplificaron con los cebadores en sentido de la VH de MFEVP1 y  
antisentido de la VL de MFEVP1 o en sentido de la VH de HFEVP1 y antisentido de la VL de HFEVP1 para dar lugar  
al producto PCR de MFEVP1 o HFEVP respectivamente. Los cebadores en sentido de VH y antisentido de VL se  
introdujeron en los sitios NcoI y NotI (que se muestran en negrita y subrayados en los cebadores) en los productos  
de la PCR, respectivamente. Por lo tanto, los terceros productos de la PCR y el plásmido pUC119 se trataron con  
estas enzimas de restricción y se ligaron para obtener los plásmidos MFEVP1/pUC119 o HFEVP1. Se verificó que  
las secuencias de ADN eran correctas mediante secuenciación del ADN.

*Introducción de la mutación VH-Y<sub>100b</sub> a VH-P<sub>100b</sub> en el plásmido MFEVP1*

La mutación Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> del dominio VH del MFEVP1 se introdujo por mutagénesis dirigida al sitio. La mutación Pro  
se introdujo en el MFEVP1/pUC119 con 5'GTTGCAGGGCCGTAC**CCG**TTTACTACTGGGGC 3' como el cebador  
en sentido y 5'GCCCCAGTAGTCAAAC**CGGG**TACGGCCCTGCAAC 3' como el cebador antisentido para dar lugar al  
MFEVP1/pUC119 (la secuencia de nucleótidos de Pro se muestra en negrita). La secuenciación de ADN verificaba  
estas mutaciones Pro.

*Construcción de los plásmidos NFEVP1/pICZaBHis y HFEVP1/pCIZaBCysHis para la expresión en levaduras*

Los plásmidos NFEVP1/pUC119 y HFEVP1/pUC119 se digirieron con SfiI y NotI y se clonó en vectores pICZaBHis o  
pPICZaBCysHis digeridos de la misma manera, respectivamente, para la expresión en levaduras. Los vectores  
pICZaBHis y pICZaBCysHis modificados, cuando se comparaban con el vector pPICZaB original (Invitrogen,  
Karlsruhe, Alemania), no contenía el marcador myc sino que estaba presente el marcador His. El vector  
pPICZaBCysHis contiene además una Cys inmediatamente antes de los seis restos de His.

*Expresión y purificación de MFE-RGD y MFE23-RGE en E. coli*

Los plásmidos MFE-RGD/pUC119 y MFE-RGE/pUC119 se electroporaron en células competentes TG1 de *E. coli* y  
se cultivaron en placas con 2xYT, que contenía ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y un 1 % de glucosa a 37 °C. Se utilizaron

colonias únicas para inocular 10 ml de medio 2xYT, que contenía ampicilina (como anteriormente) y un 1 % de glucosa y tras una dilución de 1:500 se cultivaron en 50 ml de 2xYT, ampicilina (como anteriormente) y un 0,1 % de glucosa a 37 °C hasta una  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,9. La expresión y la secreción de proteína en el medio se indujeron por adición de 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG, Sigma) y se cultivó a 30 °C O/N. El sobrenadante se separó de las células por centrifugación a 4.000 rpm durante 20 min.

#### Purificación por Ni-NTA de Qiagen

Se purificaron las proteínas MFE-RGD y MFE23-RGE en condiciones nativas a partir del sobrenadante bacteriano utilizando el kit de Columna Ni-NTA con centrifugación en líneas generales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen una columna con centrifugación que alberga una resina que contiene níquel se equilibró con "Tampón de Lisis" (véase posteriormente) antes de que el sobrenadante que contenía la proteína marcada con 6xHis se centrifugara y se lavó la columna para retirar el material no unido específicamente. Durante este procedimiento los marcadores his se unen a la resina níquel, y por lo tanto se retienen específicamente en la columna. Estas proteínas marcadas con His se eluyeron entonces con dos centrifugados con un tampón de imidazol. Las instrucciones del fabricante se siguieron con las siguientes rectificaciones: el sobrenadante bacteriano se cargó directamente en la columna equilibrada (evitando de esta manera las etapas de lisis) y esta etapa se repitió hasta que aproximadamente habían pasado 4,8 ml de sobrenadante bacteriano a través de cada columna. Se alteraron las recetas de tampón de la siguiente manera: "Tampón de Lisis": PB, 300 mM de cloruro sódico; "Tampón de lavado": PBS 300 mM de cloruro sódico, 20 mM de imidazol; "Tampón de Elución": PBS, 300 mM de cloruro sódico, 250 mM de imidazol. La proteína unida se eluyó con 2x 200  $\mu$ l de Tampón de Elución y las dos fracciones se dializaron por separado contra PBS utilizando casetes de diálisis Slice-A-Lyser (Perbio Science RU Ltd, Cramlington, RU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína dializada se retiró del Slide-A-Lyser y se almacenó a -80 °C.

#### Purificación por Streamline

Se dializaron ciento cincuenta ml de sobrenadante clarificado contra tres cambios de PBS y se añadió NaCl a una concentración final de 1 M. Las proteínas se purificaron por Quelación Streamline® (Amersham Biosciences). Se cargó la matriz con 5 volúmenes de 0,1 M  $\text{CuSO}_4$  durante 5 min, el exceso de  $\text{CuSO}_4$  se lavó con 5 volúmenes de  $\text{dH}_2\text{O}$  y se equilibró con 10 volúmenes de tampón de unión (PBS/1 M de NaCl). El sobrenadante dializado se mezcló con los 1,5 ml de matriz cargada y se vertió en una columna pequeña. Las proteínas no unidas específicamente se lavaron de la columna con PBS/1 M de NaCl seguido por 40 mM de imidazol/PBS/1 M de NaCl. Las proteínas se eluyeron con 200 mM de Imidazol/PBS/1 M de NaCl. La matriz se lavó entonces con 5 volúmenes de 0,1 M de EDTA. Cada etapa de lavado y elución se hicieron con 4,5 ml. Las fracciones de interés se agruparon y dializaron contra PBS. Los rendimientos de proteína en la fracción de 200 mM de imidazol que se midieron tras la diálisis eran las siguientes: hMFE, 0,181 mg/ml, hMFE23-RGD, 0, 101 mg/ml y hMFE23-RGE, 0,108 mg/ml. Las muestras lavadas, eluidas y dializadas que se revelaron por Transferencia de Western se muestran en la Fig. 9 A-C.

#### Expresión y purificación de MFEVP1 y NFEVP1 en *E. coli*

Los plásmidos MFEVP1/pUC119 y NFEVP1/pUC119 se electroporaron en células competentes TG1 de *E. coli* y se cultivaron en placas con 2xYT, que contenían ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y un 1 % de glucosa a 37 °C. Se utilizaron colonias únicas para inocular 5 ml de medio 2xYT, que contenía ampicilina (como anteriormente) y un 1 % de glucosa y después de una dilución de 1:500 se cultivaron en 2x 500 ml de 2xYT, ampicilina (como anteriormente) y un 0,05 % de glucosa a 37 °C hasta que la  $DO_{600\text{ nm}}$  era de 0,9. La expresión y secreción de proteína en el medio se indujo por la adición de 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosidasa (IPTG, Sigma) y se cultivaron a 30 °C O/N. El sobrenadante se separó de las células por centrifugación a 16.000 g durante 25 min y se clarificó adicionalmente por filtración a través de membranas de 0,2  $\mu$ m (Nalgene) y posteriormente se dializaron tres veces contra PBS.

La purificación de MFEVP1 y NFEVP1 fue por cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC). Diez ml de resina quelante Streamline® cargada con Cu (GE Healthcare) se incubaron con el sobrenadante, tras la adición de 1 M de NaCl, a TA durante 1 h. La resina se recolectó se lavó con 1 M NaCl/PBS, 40 mM de imidazol y proteínas unidas se eluyeron con 200 mM de imidazol. Los 200 mM de imidazol que contenían fracciones proteicas se dializaron contra TBS, se concentraron en una celda Amicon con agitado con una membrana YM3 (Millipore) y adicionalmente se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño. La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en una columna Superdex75 en solución salina tampón Tris, pH 7,5 (TBS) a 1,5 ml/min. El MFEVP1 y NFEVP1 se eluyeron como dos picos, que representaban las formas monomérica (67 ml) y dimérica (56 ml). Sus pesos moleculares se estimaron a partir de pesos moleculares de referencia, Ovoalbúmina (44 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), y Mioglobina (17 kDa) y las formas monomérica y diméricas de MFE.

#### Expresión y purificación de NFEVP1 y HFEVP1 en *P. pastoris*

Para la expresión de NFEVP1 y HFEVP1 en *P. Pastoris* se alinearon los plásmidos NFEVP1/pPICZ $\alpha$ BHis y HFEVP1/pICZ $\alpha$ BCysHis, respectivamente, con Pmel y se transformaron en células X33 electrocompetentes (Invitrogen) por electroporación. Los transformantes se cultivaron en placas con YPDS/100 mg/ml de Zeocina

(Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) Las colonias únicas se exploraron en cuanto a la expresión de proteína e inserciones por PCR con cebadores 5'AOX y 3'AOX. La colonia con mayor expresión proteica se almacenó en un 20 % de glicerol a -80 °C. Se produjeron NFEVP1 y HFEVP1 por fermentación y se purificaron inicialmente aplicando una cromatografía de afinidad con metal inmovilizado por adsorción en lecho expandido. (22; 23). La fracción eluida de 200 mM de imidazol EBA-IMAC, que contenía NFEVP1 o HFEVP1, se dializó en PBS. Al concentrado se añadió 1 M de NaCl y se aplicó en una columna de afinidad HiTrap de 1 ml HP cargada con Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare) para una concentración adicional. La elución en fracciones de 1 ml fue mediante 500 mM de imidazol/1 M de NaCl/PBS. El eluido que contenía el diacuerpo (2 ml) se purificó adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex75 en PBS, con un caudal de 1,5 ml/min.

#### *SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y análisis de transferencia de Western*

Las proteínas se analizaron mediante SDS/PAGE utilizando geles de Tris/Glicina (Invitrogen) y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

#### *Análisis de transferencia de Western*

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana PVDF (Bio-Rad) a 125 mA durante 90 min. Para la detección con anticuerpos específicos, la membrana se bloqueó con un 5 % de proteínas lácteas (Marvel)/PBS durante 2-16 h a TA. La detección se llevó a cabo con anticuerpo de ratón anti-His4 (dilución de 1:1000) seguido por la incubación con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con HRP (dilución de 1:1000, GE Healthcare). Ambos anticuerpos se diluyeron en un 1 % de proteínas lácteas/PBS (p/v) y se incubaron durante 1 h a TA. La tinción final se consiguió por incubación con 0,25 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1/2000). Las etapas de lavado consistían en cinco lavados con un 0,1 % de Tween 20/PBS (v/v) seguidos por tres lavados con PBS.

#### *Unión de las variantes del bucle CDR3 de VH de MFE y el anticuerpo anti- $\alpha$ v con $\alpha$ v $\beta$ 6 y $\alpha$ v $\beta$ 3 por ELISA*

Se revistieron placas de noventa y seis pocillos (Placas Nunc-Immuno™, Maxi Sorp, Nalge Nunc International) con 100  $\mu$ l/pocillo de 1  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ v $\beta$ 6 o 3  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ v $\beta$ 3 (Chemicon International, Harrow, RU) en solución salina tampón Tris (TBS), pH 7,5 a TA durante 1 h o TBS como control. La placa se lavó 2 veces con un 0,1 % de Tween 20 en TBS seguido por 8 lavados con TBS, y se añadieron 150  $\mu$ l/pocillo de un 5 % de Marvel en TBS durante 1 h a TA para bloquear la unión no específica. La placa se lavó como anteriormente excepto que las soluciones de TBS contenían 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de MnCl<sub>2</sub> y 1 mM de CaCl<sub>2</sub> (TBSM), y se añadieron las diluciones de MFE, MFEVP1, NFEVP1 y HFEVP1 y de ratón anti- $\alpha$ v (1:1000, Chemicon International, Harrow, RU) en un 1 % de Marvel en TBSM (100  $\mu$ l/pocillo). La placa se incubó durante 1 h a TA, se lavó y se incubó durante 1 h con 100  $\mu$ l/pocillo de anti-MFE de conejo y con anti- $\alpha$ v en los pocillos con anti- $\alpha$ v de ratón (1:1000), se lavó e incubó durante 1 h con 100  $\mu$ l/pocillo de anti-IgG de conejo de cabra conjugado con HRP (Sigma, dilución de 1:1000) y con anti-IgG de ratón de oveja marcado con HRP (GE Healthcare, dilución de 1:1000) para los pocillos anti- $\alpha$ v. Las muestras unidas se detectaron aplicando 100  $\mu$ l del sustrato dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, Sigma) en tampón de citrato pH 5,0; la reacción se paró con 100  $\mu$ l de 4 M de HCl y se leyó la absorbancia a 480 nm en un lector de placas de Dynex Technologies. En experimentos que ensayaban la dependencia metálica de la unión de las variantes de bucle CDR3 de MFE, el diluyente era TBS que contenía 10 mM de EDTA (pH 7,5) y todas las etapas de lavado incluían 10 mM de EDTA.

#### *Unión de variantes del bucle CDR3 de VH de MFE y hMEF23-RGD, hMEF23-RGE y hMFE a CEA inmovilizado por ELISA*

Se revistieron placas de noventa y seis pocillos (como en la unión de variantes del bucle CDR3 de VH de MFE a  $\alpha$ v $\beta$ 6 inmovilizada por ELISA) con 100  $\mu$ l/pocillo de CEA a 1  $\mu$ g/ml en PBS o PBS como control, se lavó dos veces con PBS en una lavadora de placas automática (Thermo LabSystems) y se bloqueó con un 5 % de Marvel en PBS. Se diluyeron el MFEVP1, NFEVP1, MFE, hMEF23-RGD, hMEF23-RGE y hMFE en un 1 % de Marvel en PBS y se añadieron 100  $\mu$ l a los pocillos por triplicado, se lavaron como anteriormente, se incubaron con anticuerpo de ratón anti-MFE (dilución de 1:1000) para MFEVP1, NFEVP1, MFE y con anticuerpo de ratón anti-His4 (dilución de 1:1000, Qiagen Ltd.) para hMEF23-RGD, hMEF23-RGE y hMFE se lavó una vez con un 0,1 % de Tween 20/PBS y cuatro veces con H<sub>2</sub>O, y se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (dilución de 1:1000) para MFEVP1, NFEVP1, MFE y con anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón conjugado con HRP (dilución de 1:1000, GE Healthcare) para hMEF23-RGD, hMEF23-RGE, y hMFE. Tras el lavado como anteriormente con 0,1 % de Tween 20/PBS y H<sub>2</sub>O se detectó la unión con OPD y se leyó la absorbancia a 490 nm (como con la unión de variantes del bucle CDR3 de VH de MFE a  $\alpha$ v $\beta$ 6 y  $\alpha$ v $\beta$ 3 por ELISA).

#### *Análisis de citometría de flujo la unión de MFE y variantes del bucle de MFE a células LS-174T*

Se lavaron dos veces las células LS174T con PBS y se despegaron con tripsina/EDTA (Cambrex). Se incubó una media de 5 x 10<sup>6</sup> células con 50  $\mu$ g/ml de MFEVP1, NFEVP1 y MFE y se lavaron con PBS. La detección de la unión fue en primer lugar por incubación con anticuerpo de conejo anti-IgG MFE (dilución de 1:1000), se lavó con PBS y

en segundo lugar por incubación con 1 µg de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con R-Ficoeritrina (R-PE) (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) seguido por un lavado con PBS. Todas las etapas de incubación se llevaron a cabo durante 60 min a 4 °C en 100 µl de PBS que contenía un 0,1 % (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA) y un 0,1 % (p/v) de azida sódica. En los experimentos de control se omitió el anticuerpo anti-IgG de conejo.

5 Las células se fijaron (kit IntraStain, DakoCytomation) y se analizó por citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Oxford, RU).

*Análisis de citometría de flujo de la unión de MFEVP1 y MFE a la línea celular que expresa αvβ6, A375Pβ6 y la línea celular parental, A375Ppuro*

10 Las células A375Pβ6 y A375Ppuro (generadas como se había descrito anteriormente (25)) se lavaron una vez con medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 0,1 % de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y un 0,1 % (p/v) de azida sódica (DMEM 0,1/0,1) y se re-suspendió en un volumen apropiado. Se transfirieron 50 µl de esta suspensión que contenía aproximadamente  $2 \times 10^5$  células a pocillos individuales de placas de 96 pocillos con el fondo en V y se mezclaron con 50 µl de MFEVP1, MFE y 10D5 (Chemicon International, Harrow, RU) a distintas concentraciones. Tras la incubación a 4 °C durante 60 minutos, se lavaron las células dos veces con 150 µl de DMEM 0,1/0,1. Las células se re-suspendieron en 50 µl de anticuerpo de ratón tetra-His (Qiagen, Crawley, RU) se diluyeron a 1:1000 en DMEM 0,1/0,1 y se incubaron 35 minutos más a 4 °C. Las células se lavaron entonces dos veces con 150 µl de DMEM 0,1/0,1 como anteriormente. Entonces se añadió un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Alexa-488 (dilución de 1:200 en DMEM 0,1/0,1; Molecular Probes) y se incubaron las células durante otros treinta minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces como anteriormente y se transfirieron a tubos de centrifuga de 5 ml (BD Falcon 352054, suministrados por VWR, RU). Las células se analizaron en un citómetro de flujo LSR-1 FACS (Becton Dickinson, Oxford, RU) utilizando el software CellQuest.

25 *Análisis de citometría de flujo de la unión de anti-αvβ6, anti-αvβ8, anti-αvβ5, anti-αvβ3 y la línea celular que expresa αvβ1, A375Pβ6 y la línea celular parental A375Ppuro. Análisis de citometría de flujo de la expresión de integrina dirigida por RGD* – Se despegaron las células A375Pβ6 y A375Ppuro con tripsina/EDTA, se re-suspendieron en DMEM 0,1/0,1 a  $2.10^5$  células/50 µl y se mezclaron con 50 µl de anticuerpo anti-integrina (a 10 µg/ml). Tras 45 minutos a 4 °C se lavaron las células dos veces con DMEM 0,1/0,1 y los anticuerpos unidos se detectaron con 50 µl de diluciones 1:200 de anticuerpos anti-ratón conjugados con Alexafluor-488 durante 30 minutos a 4 °C. Tras dos lavados se analizaron las muestras por citometría de flujo como anteriormente. Los controles negativos recibieron concentraciones similares de IgG de ratón (Dako).

*Microscopía de inmunofluorescencia confocal de la internalización de NFEVP1.*

35 Se tripsinizaron las células A375Pβ6 y A375Ppuro, se re-suspendieron en DMEM, que contenía L-glutamina, suplementado con un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor. Las células ( $\sim 2 \times 10^6$ ) se sembraron en 2 ml del medio anterior en placas de 24 mm<sup>2</sup> que contenían cubreobjetos de cristal y se permitió que se pegaran durante 48 h a 37 °C. Se retiró el medio y se cambió por DMEM que contenía un 1 % de suero fetal bovino inactivado por calor y 50 µg/ml de NFEVP1 y se incubó directamente a 10 min, 30 min, 1 h a 37 °C o se incubó primero a 4 °C durante una hora, con lo cual se retiraba el scFv, y las células se cambiaron a 37 °C. Tras la incubación las células de los cubreobjetos se lavaron con PBS, que contenía 2 mM de  $CA^{2+}$  y 1 mM de  $Mg^{2+}$ , se fijaron en un 4 % de paraformaldehído/PBS durante 20 min en hielo, se lavaron con PBS y se incubaron con 10 mM de cloruro amónico durante 10 min a TA, se lavaron, permeabilizaron con un 0,1 % de Triton X-100 durante 5 min en hielo, se lavaron y se bloquearon con un 3 % (p/v) de BSA/PBS durante 20 min a TA. Se lavaron las células y se tiñeron con 10 mg/ml de anticuerpo Affini Pure de conejo anti-IgG de ratón (H+L, Jackson Immune Research) en un 1 % (p/v) de BSA/PBS, se lavaron y tiñeron con 10 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 546® (H+L, Molecular Probes, Invitrogen), que contenía trihidrocloruro de Hoechst (1:5000) en un 1 % (p/v) de BSA/PBS, se lavaron tres veces con PBS y una vez con H<sub>2</sub>O. Todos los lavados se hicieron tres veces con PBS si no se indica otra cosa. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos utilizando el medio de montaje ProLong Gold (Molecular Probes, Invitrogen). Las células se visualizaron en un microscopio de barrido confocal Olympus® (Olympus, Londres, RU).

*Ensayos de migración*

55 Se llevaron a cabo los ensayos de migración celular haptotáticos utilizando filtros de policarbonato revestidos (tamaño del poro 8 µm, Transwell®, Becton Dickinson, Oxford, RU). La membrana bajo la superficie se revistió con LAP (0,5 µg/ml) en α-MEM durante 1 hora a 37 °C y se bloqueó con tampón de migración (un 0,1 % de BSA en α-MEM) durante 30 minutos a 37 °C. Para los experimentos de bloqueo, las células se incubaron con MFEVP1, NFEVP1, NFEVP1 y anticuerpo 10D5 (a 10 µg/ml, Chemicon International, Harrow, RU) durante 60 minutos a 4 °C antes de la siembra. La última cámara se cargó con 500 µl de tampón de migración, después de lo cual las células se colocaron en placas en la cámara superior de pocillos por cuadruplicado, a una densidad de  $5 \times 10^4$  en 50 µl de tampón de migración y se incubaron a 37 °C durante 20 horas. Después de la incubación, las células de la cámara inferior (incluyendo las adheridas a la superficie de la membrana) se tripsinizaron y contaron en un contador Casy 1 (Sharfe System GmbH, Alemania).

*Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) de NFEVP1 y MFE*

Se registró el espectro de FT-IR utilizando un espectrofotómetro FT-IR Perkin-Elmer 1750 equipado con un detector tipo TGS de recuperación rápida. El NFEVP1 a 0,47 mg/ml, MFE a 0,59 mg/ml y PBS de control se dializaron con tres cambios de tampón a 4 °C en 20 mM de tampón de fosfato, pH 7,5 y posteriormente se liofilizaron. El NFEVP1 y MFE se disolvieron en <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O hasta una concentración final de 10 mg/ml y el control a un volumen equivalente. Se colocaron ocho µl de cada proteína y el control en el hueco de 6 µm en uno de las dos ventanas de CaF<sub>2</sub> fabricado por especialistas (Feinoptische Werkstatt, Berlín, Alemania) que se moldeaban dentro de una micro-celda CFT FH-01 Beckman. Para los experimentos de desnaturalización la célula se expuso a temperaturas de 25 °C a 85 °C en etapas de 2-5 °C utilizando un baño de agua adjunto. Antes de la adquisición de cada espectro las muestras se mantuvieron en la temperatura deseada con el fin de estabilizar la temperatura dentro de la celda (10 min). Se adquirieron un total de 200 barridos a cada temperatura para las mediciones de desnaturalización, mientras que se adquirieron 1000 barridos para la comparación de los elementos estructurales secundarios de NFEVP1 y MFE a 30 °C cada uno. Los espectros de absorbancia se restaron primero por su tampón de control respectivo seguido por el cálculo de los espectros derivados secundarios utilizando la función de suavización de Savitsky-Golay de 13 puntos de datos.

*Inhibición de adhesión celular*

La capacidad de los anticuerpos scFv modificados y no modificados para inhibir la adhesión específica de la αvβ6 de las células fibroblásticas 3T3β6.19 marcadas con [<sup>51</sup>Cr] a LAP se llevó a cabo como se había descrito anteriormente (31).

**Resultados**

Construcción, expresión en *E. coli* y purificación de las variantes del bucle VH del scFv MFE, hMFE23-RGD (también conocido como hMFE-RGD) y hMFE23-RGE (también conocido como hMFE-RGE) y la unión de hMFE23-RGD y MFE23-RGE a CEA y αvβ6.

El anticuerpo MFE no tiene capacidad de unirse a αvβ6. Los intentos iniciales para conferir la afinidad para αvβ6 utilizando mutagénesis dirigida al sitio para eliminar los restos del bucle CDR3 123-128 de la cadena VH de MFE, que se sabe que son críticos para la unión con el CEA (Boehm et al., 2000b), y sustituirlos con la secuencia peptídica RGDLATL, un motivo RXDLXXL basado en la secuencia del péptido asociado a la latencia del TGFβ1 (LAP), fallaron. Además, se decidió insertar un resto de alanina antes del RGD, ya que un modelo bioinformático sugería que esto podría mejorar la presentación del motivo aumentando su accesibilidad al disolvente. Como el resto de aspartato es crítico para la unión con integrinas (Humphries, 1990), se construyó también una ARGELATL recombinante como control. Las proteínas se expresaron en *E. coli* y se secretaron en el sobrenadante. Las proteínas se purificaron a partir de los sobrenadantes bacterianos utilizando columnas de centrifuga con Níquel y se visualizaron por SDS-PAGE seguido por transferencia de Western y la detección con un anticuerpo monoclonal anti-4xHis (Figura 9).

El scFv parental, MFE, se une al CEA de manera que era importante establecer si el hMFE23-RGD y hMFE23-RGE mantenía algo de su actividad de unión. Los resultados demostraban que hMFE23-RGD y hMFE23-RGE mostraban alguna unión residual al CEA inmovilizado (Figura 10). Entonces se investigó la capacidad de hMFE23-RGD y hMFE23-RGE para unirse a αvβ6. Los resultados demostraron que tanto el hMFE23-RGD como hMFE23-RGE no demostraba ninguna unión medible a la αvβ6 inmovilizada. Aunque había un alto nivel de fondo, el hMFE23-RGD no daba señal por encima ni por debajo del control negativo hMFE23 (Figura 11).

*Construcción, expresión en E. coli y la levadura P. pastoris, y purificación de las variantes del bucle VH de los scFv MFE, MFEVP1, NFEVP1 y MFEph (P) CDR2VP1*

Para la construcción de un MFE de unión a αvβ6 se insertó la secuencia peptídica de A140-A156 de la proteína VP1 de la envoltura del virus de la enfermedad Pie-y-boca (FMDV) en la punta del bucle CDR3 de la cadena VH de MFE, entre T98 y G99 (utilizando la nomenclatura de Kabat como se muestra en la Figura 1). Esta variante del bucle VH de MFE se llamó MFEVP1. La secuencia de ADN de MFEVP1 se generó por PCR de solapamiento como se describe en Materiales y Métodos. La proteína se expresó en *E. coli* y se secretó en el sobrenadante a niveles comparables y tamaño similar a la molécula parental, el MFE. Se obtuvo la purificación inicial y concentración de la proteína por cromatografía IMAC. La proteína se purificó adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño (Fig. 2a). El MFEVP1 se eluyó como dos picos distintos, 56 ml y 67 ml, que representa las formas dimérica y monomérica, respectivamente. Se construyó una variante de bucle del scFv MFE adicional, el NFEVP1, que contenía la secuencia de unión a αvβ6 de VP1 y una mutación Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> en el dominio VH (véase la Fig. 1a) a partir de MFEVP1 por mutagénesis dirigida al sitio. La expresión y purificación en *E. coli* de esta proteína era similar al MFEVP1. La secuencia de ADN de NFEVP1 también se clonó en un vector de levaduras para la expresión en *P. pastoris*. El NFEVP1 se obtuvo a 56 mg/ml tras la cromatografía EDB-IMAC inicial, utilizando los procedimientos que se habían descrito previamente (22, 23). El NFEVP1 se concentró y la purificación final fue por cromatografía de exclusión por tamaño (Fig. 2b). El perfil cromatográfico de la proteína expresada en levaduras se sobreponía

virtualmente al obtenido en *E. coli*.

Se construyó una variante del bucle de VH de MFE adicional, shMFE(P)CDR2VP1, insertando el péptido A140-A156 de VP1 entre las secuencias de ADN de los restos de la CDR2 de VH E53 y N54 de la secuencia de shMFE<sup>2</sup> (que contenía la mutación Y<sub>100b</sub>P). Esta secuencia de ADN se clonó en el vector de levaduras y se expresó en *P. pastoris*. La proteína expresada se analizó por SDS-PAGE y transferencia de Western, que mostraban que la proteína se expresaba establemente en levaduras.

#### *Unión de MFEVP1 y NFEVP1 a $\alpha\beta$ 6 e inhibición de la migración*

Se investigó la capacidad de las formas monoméricas puras de MFEVP1 y NFEVP1 para unirse a  $\alpha\beta$ 6. El MFEVP1 mostraba una unión a  $\alpha\beta$ 6 inmovilizada en placas dependiente de la concentración en ELISA cuando se hibridaba con un anti-MFE seguido por un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Fig. 3a). Por el contrario, la lectura del MFE parental, ensayado en condiciones idénticas, era similar a los niveles de fondo. De acuerdo con la unión al ligando de integrina dependiente de metal el MFEVP1 no se unía en presencia de EDTA (datos no mostrados).

También se investigó la capacidad de MFEVP para unirse a  $\alpha\beta$ 6 cuando se expresaba en células. El MFEVP1 mostraba unión a las células A375P $\beta$ 6 (una línea celular de melanoma transfectada con ADNc  $\beta$ 6 retrovíricamente (25)) por citometría de flujo cuando se controlaba con anti-His de ratón seguido por anticuerpo anti-Fc de ratón conjugado con Alexa488 (Fig. 3b). Los cambios de fluorescencia que se observaban eran similares para las concentraciones de 5  $\mu$ g/ml y 0,5  $\mu$ g/ml, indicando que el MFEVP1 alcanzaba casi los niveles de saturación de unión a 0,5  $\mu$ g/ml. El anticuerpo específico de  $\alpha\beta$ 6, 10D5, se incluyó como control positivo, mientras que el MFE, el control negativo, no cambiaba más allá de los niveles del fondo. Ni el 10D5, MFEVP1 ni MFE presentaban unión a la célula parental no transfectada, A375Ppuro (transfectada con el vector vacío), confirmando que la unión observada de MFEVP1 a la línea celular transfectada con  $\beta$ 6 era específicamente a  $\alpha\beta$ 6.

La capacidad de los scFv insertados con VP1 para inhibir funcionalmente la migración de células que expresan  $\alpha\beta$ 6 se investigó a continuación. Se permitió que las células VB6, una línea celular de SCC oral bien caracterizada transfectada con ADNc  $\beta$ 6 retrovíricamente (27), migraran hacia el ligando de unión específico de  $\alpha\beta$ 6, LAP, que estaba revistiendo la parte inferior de un filtro Transpocillo. La adición de 50  $\mu$ g/ml de MFEVP1 y el mutante Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub>, NFEVP1, a las células VB6 inhibía considerablemente su migración cuando se comparaba con MFE (Fig. 3c). La función de bloqueo específica del anticuerpo 10D5 añadido a 10  $\mu$ g/ml mostraba niveles similares de inhibición de la migración celular de las células VB6 que los scFv. La inhibición de la migración era dependiente de la concentración como se muestra para el MFEVP1 (Fig. 3d).

#### *Investigación de la unión de las variantes del bucle de VH del scFv MFE a integrinas distintas de $\alpha\beta$ 6*

La reactividad cruzada de MFEVP1 y NFEVP1 con integrinas distintas de  $\alpha\beta$ 6 se investigó primero por ELISA, utilizando  $\alpha\beta$ 3 y  $\alpha\beta$ 6 inmovilizadas, y por estudios de unión celular utilizando células que expresan varias integrinas. Los resultados demostraban que MFEVP1 y NFEVP1 no se unían a la  $\alpha\beta$ 3 inmovilizada en un ELISA cuando se hibridaba con un anticuerpo de conejo anti-MFE seguido por un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con HRP (Fig. 4a) mientras que se observaba la unión con  $\alpha\beta$ 6. La inmovilización de ambas integrinas a los pocillos se confirmó con un anticuerpo anti- $\alpha$ . La selectividad del MFEVP1 y NFEVP1 por  $\alpha\beta$ 6 estaba también de acuerdo con los estudios de unión celular descrito en "Unión de variantes del bucle de VH del scFv MFE a  $\alpha\beta$ 6 e inhibición de la migración" (que se muestra en la Fig. 3b). Debido a que ambos scFv no se unían a la línea celular A375Ppuro no transfectada, que expresa  $\alpha\beta$ 3 a niveles similares que la línea celular A375P $\beta$ 6 transfectada con  $\beta$ 6 (Fig. 4b), esto estaba de acuerdo con los resultados del ELISA en los que el MFEVP1 y NFEVP1 no se unían a  $\alpha\beta$ 3 con niveles detectables. Además, las células A375Ppuro también expresaban  $\alpha\beta$ 8,  $\alpha\beta$ 5 y  $\alpha\beta$ 1 a niveles similares a los que se encuentran en las células A375P $\beta$ 6 (Fig. 4b) que mostraban que MFEVP1 y NFEVP1 tampoco se unían con niveles detectables a estas integrinas.

#### *Unión de MFEVP1 y NFEVP1 a CEA*

El scFv parental MFE, se une a CEA de manera que era importante establecer si el MFEVP1 mantenía algo de su actividad de unión. Los resultados demostraban que el MFEVP1 demostraban una unión residual al CEA inmovilizado en ELISA de una manera dependiente de la concentración, aunque considerablemente menor que la que se veía para el MFE (Fig. 5a) cuando se revelaba con anticuerpo de conejo anti-MFE y anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con HRP. El mutante, Tyr<sub>100b</sub> a Pro<sub>100b</sub>, NFEVP1, no mostraba unión residual en el ELISA al CEA inmovilizado. Esta misma mutación cuando se introducía en MFE había demostrado anteriormente que abolía completamente la unión al CEA (19). También se investigó la capacidad de MFEVP1 para unirse al CEA cuando se expresa en las células. Estos experimentos demostraban que el MFEVP1 se unía a la línea celular LS174T de adenocarcinoma de colon humano, que se sabe que expresa altos niveles de CEA, como se revelaba por citometría de flujo con anticuerpo de conejo anti-MFE seguido por anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con ficoeritrina (Fig. 5b). El cambio de intensidad de fluorescencia solo era ligeramente menor que el de la molécula parental, MFE, según se medía por intensidad de fluorescencia regulada, del 53,8 % para MFE y del 42,5 % para

MFEVP1. Coherentemente con los resultados del ELISA el mutante Tyr<sub>100b</sub> a Pro<sub>100b</sub>, NFEVP1, no mostraba unión a estas células, la intensidad de fluorescencia observada era igual a la del control de omisión. La mutación Tyr<sub>100b</sub> a Pro<sub>100b</sub> era capaz por lo tanto de eliminar toda unión residual de NFEVP1 al CEA como se había visto anteriormente para la molécula parental, MFE.

5

#### *Internalización de NFEVP1 en las células A375P transfectadas con $\beta 6$*

Habiendo demostrado la unión de NFEVP1 a la  $\alpha v \beta 6$  en las células, los inventores investigaron entonces si la unión de NFEVP1 con  $\alpha v \beta 6$  en la superficie celular daba lugar a la internalización del scFv en estas células. Por lo tanto, se incubaron las células A375P transfectadas con  $\beta 6$  a 4 °C con NFEVP1 durante 1 h, se retiró el scFv y las células se incubaron a distintas temperaturas (como se describe en Materiales y Métodos y se muestra en la Fig. 6) a 37 °C. Tras 10 minutos de incubación a 37 °C el scFv se veía como una delgada línea bien definida rodeando, a cierta distancia, el núcleo (tinción de Hoechst y se muestra en azul) cuando se revela con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón seguido por anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor®546 y se muestra en rojo; tipificando su localización en la membrana plasmática. Tras 3 h de incubación el scFv se difundía y manchaba alrededor del núcleo, identificando su localización dentro de las células. El scFv también se encontraba dentro de las células 30 minutos y 1 h tras la incubación de las células a 37 °C (datos no mostrados). Cuando se compara con los experimentos equivalentes de incubación de 10 min y 3 h del NFEVP1 con las células A375P puro y el experimento de control en el que el scFv se omitía, se puede concluir que los niveles de fluorescencia estaban significativamente por encima del nivel de fondo; los experimentos se registraron y representaron en condiciones idénticas. Se aseguró que la internalización está mediada completamente por  $\alpha v \beta 6$  y ningún otro mecanismo por pre-incubación de scFv a 4 °C y retirándolo antes de la incubación a 37 °C ya que los resultados de citometría de flujo (véase anteriormente) mostraban que el NFEVP1 se unía solo a las células transfectadas con  $\beta 6$  y no a las células puro. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares cuando las células se incubaban sin la pre-incubación previa a 4 °C y la retirada del scFv (datos no mostrados).

25

#### *Espectroscopia infrarroja de transformación de Fourier (FT-IR) de NFEVP1*

Habiendo obtenido el NFEVP1, monomérico, identificada la unión a  $\alpha v \beta 6$  y la inhibición de la migración de las células que expresan  $\alpha v \beta 6$ , se investigó si la inserción el péptido 17-mérico VP1 había afectado la estructura y estabilidad de la proteína en comparación con la molécula parental, MFE. El 2º espectro derivado de FT-IR de NFEVP1 y MFE virtualmente se superponían. El NFEVP1 mostraba una fuerte banda a 1635 cm<sup>-1</sup> de acuerdo con una proteína cuya estructura consiste principalmente en láminas  $\beta$  y la que se mostraba previamente en la estructura por rayos X de MFE (25). Los elementos estructurales secundarios asociados con las bandas de FT-IR se habían asignado previamente a MFE (26). La intensidad de la banda de láminas  $\beta$  a 1635 cm<sup>-1</sup> se utilizó para controlar la estabilidad de la proteína; con el aumento de la temperatura esta banda reducía su intensidad según se desnaturizaba la proteína. El registro de la curva de la desnaturización y el ajuste a una curva sigmoidea daba un punto medio de desnaturización a 45 °C para NFEVP1 (Fig. 7b). Para el MFE, esta temperatura era de 47 °C, idéntica al valor informado anteriormente (28). Por lo tanto, la inserción del péptido VP1 no afectaba la estructura de la proteína y el NFEVP1 tenía una estabilidad muy similar en comparación con el MFE.

40

#### *Expresión, purificación, unión a $\alpha v \beta 6$ e inhibición de la unión celular del NFEVP1 humanizado estabilizado (HFEVP1)*

Habiendo establecido que el scFv murino, MFE, se puede utilizar como armazón para la introducción del péptido de unión a  $\alpha v \beta 6$ , VP1, se aplicó la misma estrategia pero utilizando el MFE humanizado estabilizado descrito anteriormente (HFE) (27) como armazón. El vector de expresión proteico se obtuvo mediante PCR solapada idéntica al análogo murino con la mutación Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> en la cadena pesada que eliminaba la unión con el CEA. El NFEVP1 humanizado estabilizado (HFEVP1) se expresaba a 115 mg/l por la *P. pastoris*, determinado tras una cromatografía EDB-IMAC inicial. La proteína formada era casi exclusivamente un dímero como se reveló por cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 8 (a)). Las fracciones que contenían el dímero se separaron y se utilizaron para los experimentos posteriores. El HFEVP1 se unía a la  $\alpha v \beta 6$  inmovilizada en un ELISA cuando se hibridaba con anti-His seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP (Figura 8 (b)). El HFEVP1 también inhibía la adhesión de células 3T3 $\beta 6.19$  hacia LAP (Figura 8 (c)). El HFEVP1 era el inhibidor más potente ensayado en el ensayo. Los valores de la CI50 determinados en el ensayo eran de 21,97  $\mu$ g/ml (768  $\mu$ M) para NFEVP1, 8,42  $\mu$ g/ml (56,1  $\mu$ M) para 10D5 y 2,55  $\mu$ g/ml (45,14  $\mu$ M) para HFEVP1.

55

#### **Conclusión**

Los anticuerpos completos con especificidad por su diana se han obtenido clásicamente por tecnologías de exploración en hibridomas tras la inmunización con un antígeno (30). Una estrategia adicional bien establecida que selecciona scFv es la tecnología de fago de presentación donde se presentan repertorios de scFv en la superficie de bacteriófagos filamentosos y se explora la unión al antígeno (31). Además, se pueden generar anticuerpos con especificidades de unión por sus dianas mediante una estrategia basada en la estructura racional, injertando una secuencia de unión de un ligando a una diana en la región CDR del anticuerpo.

65

En el presente documento los inventores describen la generación del scFv, MFEVP1, con una especificidad de unión

por  $\alpha\beta 6$ , mediante una estrategia basada en la estructura racional por la inserción de la región de unión de la proteína de la envoltura vírica, VP1, del virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), serotipo O, en la región del bucle CDR3 del dominio VH de MFE. Los datos estructurales previos de la VP1 habían identificado el motivo RGD de unión a la integrina en la punta del bucle GH (32; 33). Se identificó un motivo adicional, DLXXL, mediante presentación de bibliotecas peptídicas en fagos como crucial para la unión con  $\alpha\beta 6$  (12). En la VP1 este motivo incluye el resto D de la secuencia RGD y los dos restos L se disponen en un motivo DLXXL.

La variante del bucle de scFv resultante, llamada MFEVP1, se expresó en *E. coli* y se secretó en el medio a niveles comparables al MFE parental. La purificación fue por medio del marcador His seguido por cromatografía de exclusión por tamaño para obtener la forma monomérica.

Los inventores demostraron por ELISA que el scFv monomérico se unía a la  $\alpha\beta 6$  inmovilizada y por citometría de flujo cuando se expresaba en las células. De acuerdo con las interacciones de ligando-integrina la unión era dependiente de metal y se abolía en presencia de EDTA. Además, el MFEVP1 inhibía la migración de células que expresan  $\alpha\beta 6$  hacia su ligando, el LAP-1.

El MFEVP1 era específico para la integrina  $\alpha\beta 6$  y no mostraba unión a niveles detectables con  $\alpha\beta 3$  en ELISA ni con  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha\beta 5$  y  $\alpha 5\beta 1$  expresados en las células.

Se había previsto que la inserción en la región de unión VP1 de la cepa tipo O de FMDV en el MFE era una estrategia prometedora con el fin de desarrollar un scFv con especificidad por  $\alpha\beta 6$  debido a que los estudios previos habían demostrado que en células transfectadas con  $\beta 6$  el  $\alpha\beta 6$  funciona como el receptor principal para el acoplamiento del virus, mientras que otras integrinas epiteliales que se expresan, a saber  $\alpha 5\beta 1$  o  $\alpha\beta 5$  parece que no tienen ese papel (34).

El MFEVP1 tiene la especificidad por  $\alpha\beta 6$  deseada, sin embargo, también mantiene una unión residual a la diana parental, CEA. Esta unión se pudo eliminar cuando se mutó el resto de VH Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub>, generando así el NFEVP1. Los trabajos previos habían demostrado que la unión de MFE con CEA se abolía cuando se introducía esta mutación en MFE (19). Las interacciones de MFE-CEA se previeron a partir de la forma en que una molécula de MFE interactuaba con otra molécula de MFE en la estructura de rayos X y esto resaltó la importancia del Y<sub>100b</sub> (2). Esto se elaboró adicionalmente por un estudio de modelado posterior de la interacción de MFE con CEA (35).

El péptido de unión a  $\alpha\beta 6$  no afectaba la estructura del scFv y mantenía un punto medio de desnaturalización similar en comparación con el MFE, el NFEVP1, 45 °C, MFE, 47 °C, según se determinó por espectroscopia FT-IR.

Se había sugerido una correlación entre la expresión de  $\alpha\beta 6$  y la progresión del carcinoma debido a su capacidad para modular la invasión, inhibir la apoptosis, regular la expresión de proteasa y activar el TGF- $\beta 1$  (36). El  $\alpha\beta 6$  también se ha destacado como una diana del cáncer prometedora debido a su expresión *de novo* en varios tejidos cancerosos (36). Un péptido de unión 12-mérico ha demostrado ser prometedor en la mediación de destrucción por células T de las dianas tumorales ováricas que expresan  $\alpha\beta 6$  cuando se fusiona con un dominio extracelular Fc bisagra de IgG4 humana y con la cola citoplasmática de CD3- $\xi$  (37).

Aunque los scFv puede que no sean propiamente buenos agentes de direccionamiento debido a su rápido aclaramiento de la sangre permiten fusiones genéticas con toxinas, que aumentan el tamaño y enlentecen el aclaramiento sanguíneo, en particular cuando la toxina forma disposiciones diméricas o multiméricas, que introducirán avidez. El suministro de fusiones scFv-toxina se beneficiará de su capacidad para internalizarse en células A375P $\beta 6$  que expresan  $\alpha\beta 6$ . Los scFv también pueden unirse multiméricamente a vehículos que portan fármacos, tales como liposomas y polímeros. Los scFv se pueden convertir en anticuerpos completos para la presentación dimérica, explotando las funciones tóxicas intrínsecas, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Una construcción que proporciona una buena penetración tumoral, alta retención de diana, debido a su unión dimérica, y un rápido aclaramiento sanguíneo es el diacuerpo (38). El diacuerpo tiene un tamaño el doble que el scFv y es considerablemente más pequeño que un anticuerpo completo. Se genera por acortamiento del enlazador VH-VL del scFv (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> en enlazador Gly<sub>4</sub>Ser, que fuerza a emparejarse a dominios VH y VL de diferentes cadenas (39).

Un problema principal de la terapia del cáncer es la inmunogenicidad del anticuerpo terapéutico en particular en un tratamiento repetido. El NFEVP1 es de origen murino y es probable que dé como resultado reacciones inmunogénicas en seres humanos. Por lo tanto, estudios previos habían afrontado este problema convirtiendo el MFE en una versión humanizada (27). La comparación de la estructura por rayos X de MFE con un análogo humano permitía la identificación de 28 restos de superficie para la humanización de MFE (25). Estos restos cuando se introducían en el MFE en combinación con tres mutaciones adicionales para la estabilización que se identifican por maduración de la expresión presentada por levaduras, producía un MFE humanizado estabilizado (27). En este estudio el MFE humanizado estabilizado se utilizó como armazón para insertar el péptido VP1 y combinado con la mutación Y<sub>100b</sub> a P<sub>100b</sub> daba lugar al HFEVP1. La proteína se expresaba casi exclusivamente como un dímero en *P. pastoris* como se demostraba por cromatografía de exclusión por tamaño. El HFEVP1 se unía a  $\alpha\beta 6$  en ELISA e inhibía la adhesión de células que expresaban  $\alpha\beta 6$  a LAP imitando de esta manera el comportamiento del análogo

murino. El HFEVP1 era ligeramente mejor inhibidor que el anticuerpo completo disponible en el mercado, el 10D5; el valor de la CI50 para HFEVP1 era 2,55 µg/ml (45,14 µM) y para 10D5 era 8,42 µg/ml (56,1 µM).

En conclusión, se generó un scFv de unión a αvβ6 por la inserción del péptido VP1 que contenía RGD de FMDV en el MFE que no se unía a la diana de MFE, el CEA, cuando se combinaba con la mutación VHY<sub>100b</sub> a VHP<sub>100b</sub>. Este estudio ha demostrado que el MFE-23 (incluyendo las variantes humanizadas) son buenos armazones para la inserción peptídica para alterar la especificidad de unión del scFv. El anticuerpo MFE-23 (incluyendo las variantes humanizadas) se podía concebir por lo tanto, para utilizarse para obtener otros antígenos dirigidos al tumor utilizando una estrategia similar.

## Referencias

1. Hynes, R. O. (2002) *Cell* 110, 673-687
2. Ruoslahti, E. (1991) *J. Clin. Invest* 87, 1-5
3. Giancotti, F. G. y Mainiero, F. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 47-64
4. Breuss, J. M., Gallo, J., DeLisser, H. M., Klimanskaya, I. V., Folkesson, H. G., Pittet, J. F., Nishimura, S. L., Aldape, K., Landers, D. V., Carpenter, W., y. (1995) *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6), 2241-2251
5. Ahmed, N., Pansino, F., Clyde, R., Murthi, P., Quinn, M. A., Rice, G. E., Agrez, M. V., Mok, S., y Baker, M. S. (2002) *Carcinogenesis* 23, 237-244
6. Arihiro, K., Kaneko, M., Fujii, S., Inai, K., y Yokosaki, Y. (2000) *Breast Cancer* 7, 19-26
7. Sipos, B., Hahn, D., Carceller, A., Piulats, J., Hedderich, J., Kalthoff, H., Goodman, S. L., Kosmahl, M., y Kloppel, G. (2004) *Histopathology* 45, 226-236
8. Ramos, D. M., But, M., Regezi, J., Schmidt, B. L., Atakilil, A., Dang, D., Ellis, D., Jordan, R., y Li, X. (2002) *Matrix Biology* 21, 297-307
9. Bates, R. C., Bellovin, D. I., Brown, C., Maynard, E., Wu, B., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Oettgen, P., y Mercurio, A. M. (2005) *J. Clin. Invest* 115, 339-347
10. Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., y Sheppard, D. (1999) *Cell* 96, 319-328
11. Jackson, T., King, A. M., Stuart, D. I., y Fry, E. (2003) *Virus Res.* 91, 33-46
12. Kraft, S., Diefenbach, B., Mehta, R., Jonczyk, A., Luckenbach, G. A., y Goodman, S. L. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 1979-1985
13. Mateu, M. G., Valero, M. L., Andreu, D., y Domingo, E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 12814-12819
14. Chester, K. A., Begent, R. H., Robson, L., Keep, P., Pedley, R. B., Boden, J. A., Boxer, G., Green, A., Winter, G., Cochet, O., y. (1994) *Lancet* 343, 455-456
15. Begent, R. H., Verhaar, M. J., Chester, K. A., Casey, J. L., Green, A. J., Napier, M. P., Hope-Stone, L. D., Cushen, N., Keep, P. A., Johnson, C. J., Hawkins, R. E., Hilson, A. J., y Robson, L. (1996) *Nat. Med.* 2, 979-984
16. Mayer, A., Tsiompanou, E., O'Malley, D., Boxer, G. M., Bhatia, J., Flynn, A. A., Chester, K. A., Davidson, B. R., Lewis, A. A., Winslet, M. C., Dhillon, A. P., Hilson, A. J., y Begent, R. H. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6, 1711-1719
17. Chester, K. A., Bhatia, J., Boxer, G., Cooke, S. P., Flynn, A. A., Huhlov, A., Mayer, A., Pedley, R. B., Robson, L., Sharma, S. K., Spencer, D. I., y Begent, R. H. (2000) *Dis. Markers* 16, 53-62
18. Chester, K. A., Mayer, A., Bhatia, J., Robson, L., Spencer, D. I., Cooke, S. P., Flynn, A. A., Sharma, S. K., Boxer, G., Pedley, R. B., y Begent, R. H. (2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 Suppl, S8-12
19. Read, D. A., Chester, K. A., Keep, P. A., Begent, R. H. J., Pedersen, J. T., y Rees, A. R. (1995) *Br. J. Cancer* 71,
20. Lanza, P., Felding-Habermann, B., Ruggeri, Z. M., Zanetti, M., y Billetta, R. (1997) *Blood Cells Mol. Dis.* 23, 230-241

21. Lanza, P., Billetta, R., Antonenko, S., y Zanetti, M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 11683-11687
22. McLane, K. E., Burton, D. R., y Ghazal, P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5214-5218
- 5 23. Moroncini, G., Kanu, N., Solforosi, L., Abalos, G., Telling, G. C., Head, M., Ironside, J., Brockes, J. P., Burton, D. R., y Williamson, R. A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10404-10409
24. Burman, A., Clark, S., Abrescia, N. G., Fry, E. E., Stuart, D. I., y Jackson, T. (2006) *J. Virol.* 80, 9798-9810
- 10 25. Dicara, D., Rapisarda, C., Sutcliffe, J. L., Violette, S. M., Weinreb, P. H., Hart, I. R., Howard, M. J., y Marshall, J. F. (2007) *J. Biol. Chem.*
26. Boehm, M. K., Corper, A. L., Wan, T., Sohi, M. K., Sutton, B. J., Thornton, J. D., Keep, P. A., Chester, K. A., Begent, R. H., y Perkins, S. J. (2000) *Biochem. J.* 346 Pt 2, 519-528
- 15 27. Thomas, G. J., Lewis, M. P., Whawell, S. A., Russell, A., Sheppard, D., Hart, I. R., Speight, P. M., y Marshall, J. F. (2001) *J. Invest Dermatol.* 117, 67-73
28. Lee, Y. C., Boehm, M. K., Chester, K. A., Begent, R. H., y Perkins, S. J. (2002) *J. Mol. Biol.* 320, 107-127
- 20 29. Tolner, B., Smith, L., Begent, R. H. J., y Chester, K. A. (2006) *Nat. Protocols* in press,
30. Kohler, G. y Milstein, C. (1975) *Nature* 256, 495-497
- 25 31. Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., y Hoogenboom, H. R. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455
32. Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., y Brown, F. (1989) *Nature* 337, 709-716
- 30 33. Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., y. (1993) *Nature* 362, 566-568
34. Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., y King, A. M. (2000) *J Virol.* 74, 4949-4956
- 35 35. Boehm, M. K. y Perkins, S. J. (2000) *FEBS Lett.* 475, 11-16
36. Thomas, G. J., Nystrom, M. L., y Marshall, J. F. (2006) *J. Oral Pathol. Med.* 35, 1-10
37. Pameijer, C. R., Navanjo, A., Meechoovet, B., Wagner, J. R., Aguilar, B., Wright, C. L., Chang, W. C., Brown, C. E., y Jensen, M. C. (2007) *Cancer Gene Ther.* 14, 91-97
- 40 38. Holliger, P. y Hudson, P. J. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23, 1126-1136
39. Holliger, P., Prospero, T., y Winter, G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6444-6448
- 45 40. FitzGerald, K., Holliger, P., y Winter, G. (1997) *Protein Eng* 10, 1221-1225
41. Graff, C. P., Chester, K., Begent, R., y Wittrup, K. D. (2004) *Protein Eng Des Sel* 17, 293-304
- 50 Chester KA, Baker M y Mayer A (2005) Overcoming the immunological response to foreign enzymes in cancer therapy *Expert Rev. Clin. Immunol.* 1: 549-559
- Hoogenboom, (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnology*, 23, 1105-1116
- Hofmeister V, Schrama D, Becker JC, Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma, *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Jul 27; in press
- 55 Li Y, Cozzi PJ, Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 2007, 33(6):521-7.
- 60 Muñoz R, Arias Y, Ferreras JM, Rojo MA, Gayoso MJ, Nocito M, Benitez J, Jiménez P, Bernabéu C, Gírbés T., Targeting a marker of the tumour neovasculature using a novel anti-human CD105-immunotoxin containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett.* 2007 Oct 18; 256(1):73-80.
- Baccala A, Sercia L, Li J, Heston W, Zhou M. Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms. *Urology.* 2007 Aug; 70 (2):385-90.
- 65 Bühler P, Wolf P, Gierschner D, Schaber I, Katzenwadel A, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, Tacke M,

Swamy M, Schamel WW, Elsässer-Beile U. A bispecific diabody directed against prostate-specific membrane antigen and CD3 induces T-cell mediated lysis of prostate cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Jun 20; in press

- 5 Johnston JB, Navaratnam S, Pitz MW, Maniate JM, Wiechec E, Baust H, Gingerich J, Skliris GP, Murphy LC, Los M. Targeting the EGFR Pathway for cancer therapy. *Curr Med Chem.* 2006, 13:3483-3492.

Listado de secuencias

- 10 MFE-23  
Clonado en pUC119 y secuencia de aminoácidos expresada en *E. coli*:

CCATGGCC  
NcoI

+ 1 cadena pesada de partida

CAGGTGAAACTGCAGCAG  
GlnValLysLeuGlnGln 6

TCTGGGGCAGAACTTGTGAGGTCAGGGACCTCAGTCAAGTTGTCCTGC  
SerGlyAlaGluLeuValArgSerGlyThrSerValLysLeuSerCys 22

**CDR 1**

ACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTCCTATATGCACTGGTTGAGG  
ThrAlaSer**GlyPheAsnIleLysAspSer**TyrMetHisTrpLeuArg 38

**CDR 2**

CAGGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAG  
GlnGlyProGluGlnGlyLeuGluTrpIleGlyTrpIle**AspProGlu** 54

**AATGGTGATACTGAATATGCCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTTTT**  
**AsnGlyAsp**ThrGluTyrAlaProLysPheGlnGlyLysAlaThrPhe 70

ACTACAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTG  
ThrThrAspThrSerSerAsnThrAlaTyrLeuGlnLeuSerSerLeu 86

**CDR 3**

ACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTAATGAGGGG**ACTCCGACT**  
ThrSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAsnGluGlyThrProThr 102

**GGCCCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC**  
**GlyProTyrTyrPheAsp**TyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrVal 118

TCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGA  
SerSerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly 134

- 15 + 1 cadena ligera de partida

TCAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCA  
 SerGluAsnValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerAlaSerPro 150

**CDR 1**

GGGAGAAGGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTAC  
 GlyGluLysValThrIleThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyr 166

ATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCAAACTCTGGATT  
 MethisTrpPheGlnGlnLysProGlyThrSerProLysLeuTrpIle 182

**CDR 2**

TATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC  
 TyrSerThrSerAsnLeuAlaSerGlyValProAlaArgPheSerGly 198

AGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCT  
 SerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerArgMetGluAla 214

**CDR 3**

GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTACCCACTC  
 GluAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnArgSerSerTyrProLeu 230

**NotI**

ACGTTTCGGTGCTGGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCGGCC  
 ThrPheGlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLysArgAlaAla 244

GCACATCACCATCATCACCAT  
 CGTGTAGTGGTAGTAGTGGTA  
 Ala His

5 MFEVP1  
 Clonado en pUC119 Expresado en *E. coli*

CCATGGCC  
 NcoI

+ 1 cadena pesada de partida

CAGGTGAAACTGCAGCAG  
GlnValLysLeuGlnGln

6

TCTGGGGCAGAACTTGTGAGGTCAGGGACCTCAGTCAAGTTGTCCTGC  
SerGlyAlaGluLeuValArgSerGlyThrSerValLysLeuSerCys

22

**CDR 1**

ACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTCCTATATGCACTGGTTGAGG  
ThrAlaSer**GlyPheAsnIleLysAspSer**TyrMetHisTrpLeuArg

38

**CDR 2**

CAGGGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATT**GATCCTGAG**  
GlnGlyProGluGlnGlyLeuGluTrpIleGlyTrpIle**AspProGlu**

54

**AATGGTGATACTGAATATGCCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTTTT**  
**AsnGlyAsp**ThrGluTyrAlaProLysPheGlnGlyLysAlaThrPhe

70

ACTACAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTG  
ThrThrAspThrSerSerAsnThrAlaTyrLeuGlnLeuSerSerLeu

86

**CDR 3**

ACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTAATGAGGGG**ACTCCGACT**  
ThrSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAsnGluGlyThrProThr

102

Péptido VP1 insertado

GCAGTTCGAATCTGCGAGGTGATCTGCAGGTGCTGGCGCAGAAAGTTGCA  
AlaValProAsnLeuArgGlyAspLeuGlnValLeuAlaGlnLysValAla

**GGCCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC**  
**CCCGGCATGGGCAA**ACTGATGACCCCGGTTCCCTGGTGCCAGTGGCAG  
**GlyProTyrTyrPheAsp**TyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrVal

118

TCCTCAGGTGGAGGCGGTT**CAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGA**  
**AGGAGTCCACCTCCGCCAAGTCCGCCTCCACCGAGACCGCCACCGCCT**  
SerSerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly

134

5

+ 1 cadena ligera de partida

TCAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCA  
 AGTCTTTTACACGAGTGGGTTCAGAGGTCGTTAGTACAGACGTAGAGGT  
 SerGluAsnValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerAlaSerPro 150

**CDR 1**

GGGGAGAAGGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTAC  
 GlyGluLysValThrIleThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyr 166

ATGCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATT  
 MetHisTrpPheGlnGlnLysProGlyThrSerProLysLeuTrpIle 182

**CDR 2**

TATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC  
 TyrSerThrSerAsnLeuAlaSerGlyValProAlaArgPheSerGly 198

AGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCT  
 SerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerArgMetGluAla 214

**CDR 3**

GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTACCCACTC  
 CTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCGTTTCCTCATCAATGGGTGAG  
 GluAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnArgSerSerTyrProLeu 230

NotI

ACGTTCCGGTGCTGGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCGGCC  
 TGCAAGCCACGACCGTGGTTCGACCTCGACTTTGCCCGCCGG  
 ThrPheGlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLysArgAlaAla 244

GCACATCACCATCATCACCAT  
 CGTGTAGTGGTAGTAGTGGTA  
 Ala His

**NFEVP1:**

Clonado en pUC119, expresado en *E. coli* y  
 clon en pPICZalphaB modificado expresado en *P. pastoris*

5

CCATGGCC  
 NcoI

+ 1 cadena pesada de partida

CAGGTGAAACTGCAGCAG  
GlnValLysLeuGlnGln 6

TCTGGGGCAGAACTTGTGAGGTCAGGGACCTCAGTCAAGTTGTCCTGC  
SerGlyAlaGluLeuValArgSerGlyThrSerValLysLeuSerCys 22

**CDR 1**

ACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACTCCTATATGCACTGGTTGAGG  
ThrAlaSerGlyPheAsnIleLysAspSerTyrMetHisTrpLeuArg 38

**CDR 2**

CAGGGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAG  
GlnGlyProGluGlnGlyLeuGluTrpIleGlyTrpIleAspProGlu 54

AATGGTGATACTGAATATGCCCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTTTT  
AsnGlyAspThrGluTyrAlaProLysPheGlnGlyLysAlaThrPhe 70

ACTACAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTG  
ThrThrAspThrSerSerAsnThrAlaTyrLeuGlnLeuSerSerLeu 86

**CDR 3**

ACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTAATGAGGGGACTCCGACT  
ThrSerGluAspThrAlaValTyrTyrCysAsnGluGlyThrProThr 102

Péptido VP1 insertado

GCAGTTCGGAATCTGCGAGGTGATCTGCAGGTGCTGGCGCAGAAAGTTGCA  
AlaValProAsnLeuArgGlyAspLeuGlnValLeuAlaGlnLysValAla

5

Mutación Tyr100b a Pro100b

GGGCCGTACCCGTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC  
CCCGGCATGGGCAAACCTGATGACCCCGGTTCCCTGGTGCCAGTGGCAG  
GlyProTyrProPheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrValThrVal 118

TCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGA  
AGGAGTCCACCTCCGCCAAGTCCGCCTCCACCGAGACCGCCACCGCCT  
SerSerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGly 134

10

+ 1 cadena ligera de partida

TCAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCA  
 AGTCTTTTACACGAGTGGGTCAGAGGTCGTTAGTACAGACGTAGAGGT  
 SerGluAsnValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerAlaSerPro 150

**CDR 1**

GGGGAGAAGCTCACCATAACTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTAC  
 GlyGluLysValThrIleThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyr 166

ATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCAAACTCTGGATT  
 MetHisTrpPheGlnGlnLysProGlyThrSerProLysLeuTrpIle 182

**CDR 2**

TATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC  
 TyrSerThrSerAsnLeuAlaSerGlyValProAlaArgPheSerGly 198

AGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCT  
 SerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerArgMetGluAla 214

**CDR 3**

GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTACCCACTC  
 CTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTTCGTTTCCTCATCAATGGGTGAG  
 GluAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnArgSerSerTyrProLeu 230

NotI

ACGTTTCGGTGCTGGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCGGCC  
 TGCAAGCCACGACCGTGGTTCGACCTCGACTTTCGCCGCGCGG  
 ThrPheGlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLysArgAlaAla 244

GCACATCACCATCATCACCAT  
 CGTGTAGTGGTAGTAGTGTA  
 Ala His

**shMFE-23**

Cys

5 Clonado en pPICzalphaB modificado Expresado en *P. pastoris*

CCATGGCC

NcoI

+ 1 cadena pesada de partida

ES 2 640 340 T3

1  
 CAA GTT AAA CTG GAA CAG TCC GGT GCT GAA GTT  
 gln val lys leu glu gln ser gly ala glu val

CDR 1

21  
 GTC AAA CCA GGT GCT TCC GTG AAG TTG TCC TGT AAA GCC TCT GGT TTT AAC ATC AAG GAT  
 val lys pro gly ala ser val lys leu ser cys lys ala ser gly phe asn ile lys asp  
 41

TCG TAT ATG CAT TGG TTG AGA CAA GGG CCA GGA CAA AGA TTG GAA TGG ATT GGC TGG ATT  
ser tyr met his trp leu arg gln gly pro gly gln arg leu glu trp ile gly trp ile  
**CDR 2**

61  
 GAT CCA GAG AAT GGT GAT ACT GAG TAC GCT CCT AAA TTT CAG GGA AAG GCT ACT TTT ACT  
asp pro glu asn gly asp thr glu tyr ala pro lys phe gln gly lys ala thr phe thr

81  
 ACC GAC ACT TCC GCT AAT ACC GCA TAC TTG GGC TTA TCT TCC TTG AGA CCA GAG GAC ACT  
 thr asp thr ser ala asn thr ala tyr leu gly leu ser ser leu arg pro glu asp thr  
 CDR 3

101  
 GCC GTA TAC TAC TGC AAC GAA GGG ACA CCA ACT GGT CCT TAC TAT TTC GAC TAC TGG GGA  
 ala val tyr tyr cys asn glu gly thr pro thr gly pro tyr tyr phe asp tyr trp gly  
 121

CAA GGT ACC TTA GTT ACT GTC TCT AGC GGT GGC GGA GGT TCA GGC GGT GGA GGG TCT GGA  
 gln gly thr leu val thr val ser ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser gly  
 +1 start light chain

141  
 GGT GGC GGT AGT GAA AAT GTG CTG ACC CAA TCT CCA AGC TCC ATG TCT gcc TCT GTT GGC  
 gly gly gly ser glu asn val leu thr gln ser pro ser ser met ser ala ser val gly  
 CDR 1

161  
 GAT AGA GTA acc ATC GCT TGT AGC GCA TCC TCT AGT GTC cca TAT ATG CAC TGG TTT CAA  
 asp arg val thr ile ala cys ser ala ser ser ser val pro tyr met his trp phe gln  
 CDR 2

181  
 CAG AAG CCA GGT AAA AGC CCA AAG TTG ttg ATT TAT TGG ACA TCC AAC TTG GCT TCT GGA  
 gln lys pro gly lys ser pro lys leu leu ile tyr ser thr ser asn leu ala ser gly  
 201

GTG CCT TCA AGG TTT TCT GGT TCC GGC TCA GGA ACC GAT TAT AGT TTG ACT ATT AGC TCA  
 val pro ser arg phe ser gly ser gly ser gly thr asp tyr ser leu thr ile ser ser  
 CDR 3

221  
 gtg CAG CCA GAG GAT GCT GCA ACC TAC TAT TGC CAG CAA AGG TCC TCA TAT CCA CTG ACT  
 val gln pro glu asp ala ala thr tyr tyr cys gln gln arg ser ser tyr pro leu thr

241  
 NotI  
 TTC GGG GGT GGA ACG AAG TTG GAA ATC AAG GCT GCG GCC  
 phe gly gly gly thr lys leu glu ile lys ala ala ala

GCC TGT CAT CAT CAT CAT CAT CAT  
 Ala Cys His His His His His His

HFEVP1  
 Cys

Clonado en pPICZalphaB modificado  
 Expresado en *P. pastoris*

CCATGGCC  
 NcoI

10  
 CAA GTT AAA CTG GAA CAG TCC GGT GCT GAA GTT  
 gln val lys leu glu gln ser gly ala glu val

CDR 1

21  
 GTC AAA CCA GGT GCT TCC GTG AAG TTG TCC TGT AAA GCC TCT GGT TTT AAC ATC AAG GAT  
 val lys pro gly ala ser val lys leu ser cys lys ala ser gly phe asn ile lys asp

41  
 TCG TAT ATG CAT TGG TTG AGA CAA GGG CCA GGA CAA AGA TTG GAA TGG ATT GGC TGG ATT  
ser tyr met his trp leu arg gln gly pro gly gln arg leu glu trp ile gly trp ile  
**CDR 2**

61  
 GAT CCA GAG AAT GGT GAT ACC GAG TAC GCT CCT AAA TTT CAG GGA AAG GCT ACT TTT ACT  
asp pro glu asn gly asp thr glu tyr ala pro lys phe gln gly lys ala thr phe thr

81  
 ACC GAC ACT TCC GCT AAT ACC GCA TAC TTG GGC TTA TCT TCC TTG AGA CCA GAG GAC ACT  
 thr asp thr ser ala asn thr ala tyr leu gly leu ser ser leu arg pro glu asp thr  
 CDR 3 Sitio de inserción del péptido

101  
 GCC GTA TAC TAC TGC AAC GAA GGG ACA CCA ACT  
 ala val tyr tyr cys asn glu gly thr pro thr

5

Péptido VP1 insertado

GCAGTTCCGAACCTGCGAGGTGATCTGCAGGTGCTGGCTCAGAAAGTTGCA  
 CGTCAAGGCTTAGACGCTCCACTAGACGTCCACGACCGAGTCTTTCAACGT  
 AlaValProAsnLeuArgGlyAspLeuGlnValLeuAlaGlnLysValAla

112

mutación de Tyr a Pro

GGT CCT TAC CCT TPC GAC TAC TGG GGA  
gly pro tyr pro phe asp tyr trp gly

121

CAA GGT ACC TTA GTT ACT GTC TCT AGC GGT GGC GGA GGT TCA GGC GGT GGA GGG TCT GGA  
 gln gly thr leu val thr val ser ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser gly  
 +1 start light chain

141

GGT GGC GGT AGT GAA AAT GTG CTG ACC CAA TCT CCA AGC TCC ATG TCT gct TCT GTT GGC  
 gly gly gly ser glu asn val leu thr gln ser pro ser ser met ser ala ser val gly  
 CDR 1

161

GAT AGA GTA acc ATC GCT TGT AGC GCA TCC TCT AGT GTC cca TAT ATG CAC TGG TTT CAA  
 asp arg val thr ile ala cys ser ala ser ser ser val pro tyr met his trp phe gln  
 CDR 2

181

CAG AAG CCA GGT AAA AGC CCA AAG TTG ttg ATT TAT TCG ACA TCC AAC TTG GCT TCT GCA  
 gln lys pro gly lys ser pro lys leu leu ile tyr ser thr ser asn leu ala ser gly

201

GTG CCT TCA AGG TTT TCT GGT TCC GGC TCA GGA ACC GAT TAT AGT TTG ACT ATT AGC TCA  
 val pro ser arg phe ser gly ser gly ser gly thr asp tyr ser leu thr ile ser ser  
 CDR 3

221

gtg CAG CCA GAG GAT GCT GCA ACC TAC TAT TGC CAG CAA AGG TCC TCA TAT CCA CTG ACT  
 val gln pro glu asp ala ala thr tyr tyr cys gln gln arg ser ser tyr pro leu thr

NotI

TTC GGG GGT GGA ACG AAG TTG GAA ATC AAG GCT GCG GCC  
 phe gly gly gly thr lys leu glu ile lys ala ala ala

GCC TGT CAT CAT CAT CAT CAT CAT  
 Ala Cys His His His His His His

## REIVINDICACIONES

1. Un método de modificación de un anticuerpo parental en un anticuerpo capaz de unirse a la integrina  $\alpha v\beta 6$ , en el que el anticuerpo parental comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):
- 5
- (a) CDR 1 de cadena pesada: Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser; y
  - (b) CDR 2 de cadena pesada: Asp Pro Glu Asn Gly Asp; y
  - (c) CDR 3 de cadena pesada: (i) Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp, o (ii) Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Phe Asp;
- 10
- y
  - (d) CDR 1 de cadena ligera: (i) Ser Ser Ser Val Pro, o (ii) Ser Ser Ser Val Ser; y
  - (e) CDR 2 de cadena ligera: (i) Ser Thr Ser, o (ii) Leu Thr Ser; y
  - (f) CDR 3 de cadena ligera: Arg Ser Ser Tyr Pro Leu;
- 15 y el método comprende insertar una secuencia de aminoácidos AVPNLRGDLQVLAQKVA entre los restos de aminoácidos adyacentes Thr98 y Gly99 de CDR H3 (en la nomenclatura de Kabat) del anticuerpo parental.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la humanización del anticuerpo o del anticuerpo parental mutando uno o más restos de aminoácidos.
- 20 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo parental es un scFv o un diacuerpo.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el scFv o el diacuerpo comprenden un enlazador que tiene la secuencia  $(Gly_4Ser)_n$  en donde n es entre 1 y 4.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la inserción reduce la unión del anticuerpo parental al antígeno carcinoembrionario humano (CEA).
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende además la conjugación del anticuerpo con
- (i) un resto detectable; y/o
  - (ii) un resto terapéuticamente activo; y/o
  - (iii) un grupo marcador para su uso en la purificación o la detección; y/o
- 35 (iv) uno o más restos citotóxicos, un agente capaz de convertir un profármaco en un resto citotóxico, un radiosensibilizante y/o un átomo radioactivo.
7. El método de la reivindicación 6, en el que
- 40 el resto detectable es detectable por Creación de Imágenes por Resonancia Magnética (MRI), Espectroscopia por Resonancia Magnética (MRS), Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único (SPECT), Tomografía de Emisión de Positrones (PET) o creación de imágenes ópticas, y/o es un resto radioactivo;
- el resto terapéuticamente activo es un agente anti-cáncer;
- el grupo marcador es un c-Myc o un grupo poli-histidina; y/o
- 45 el resto citotóxico es un agente quimioterápico o un polipéptido citotóxico y/o el agente capaz de convertir un profármaco en un resto citotóxico es una enzima para su uso en una terapia con profármaco-enzima dirigidos por anticuerpo (ADEPT).

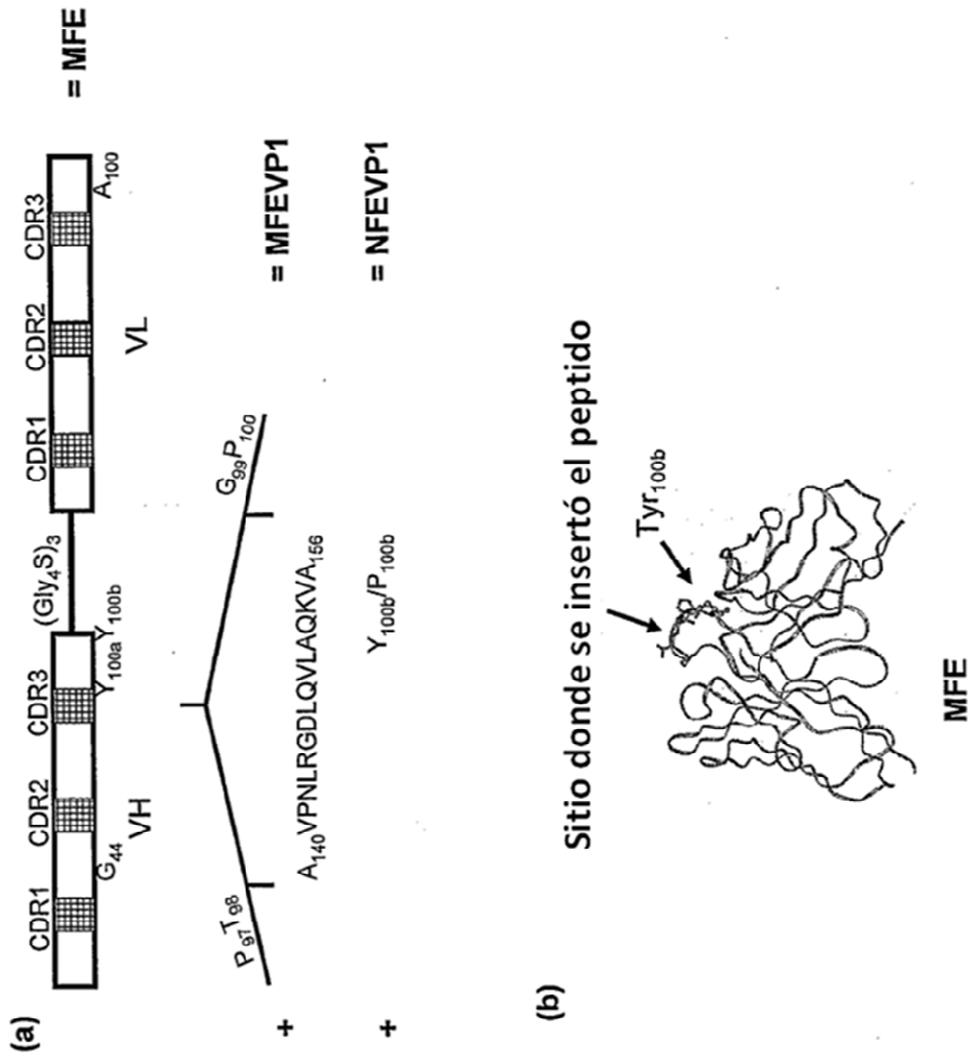


Figura 1

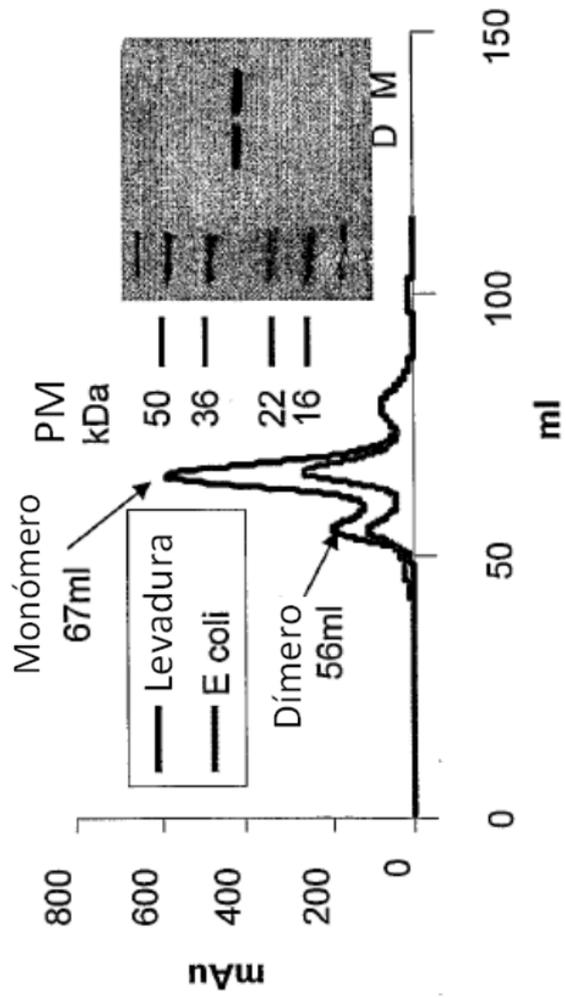


Figura 2

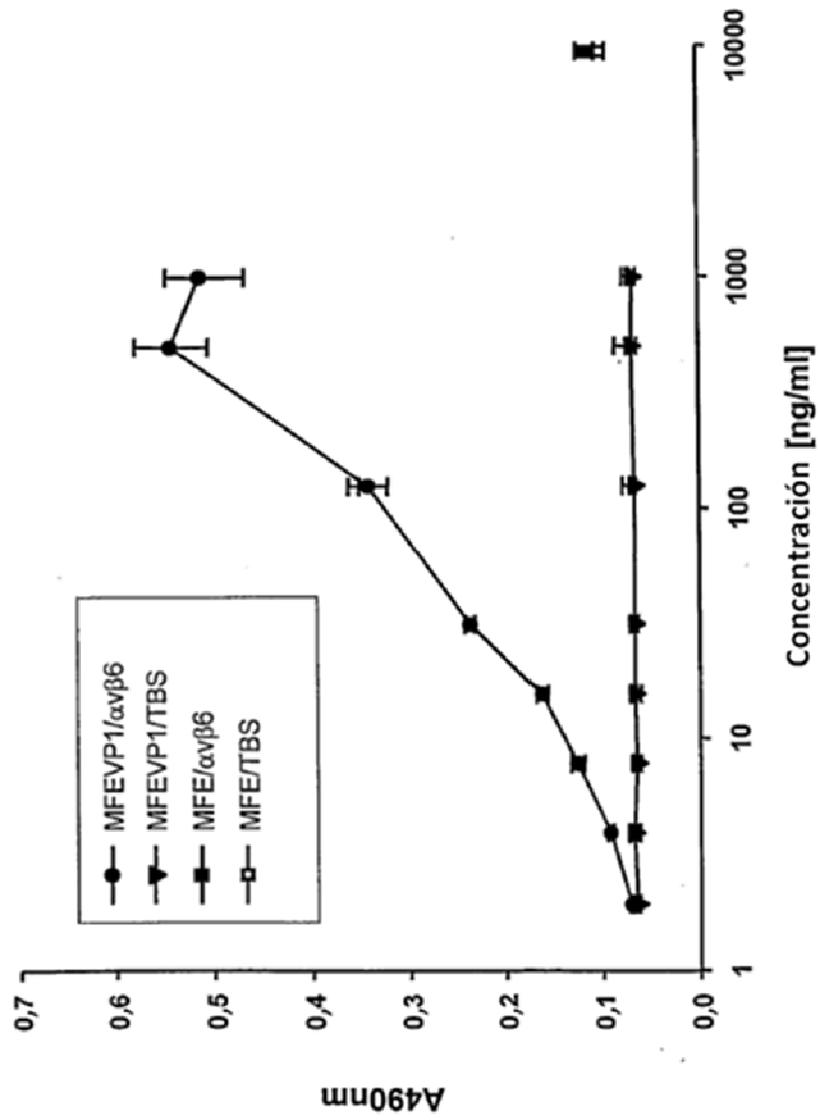


Figura 3a

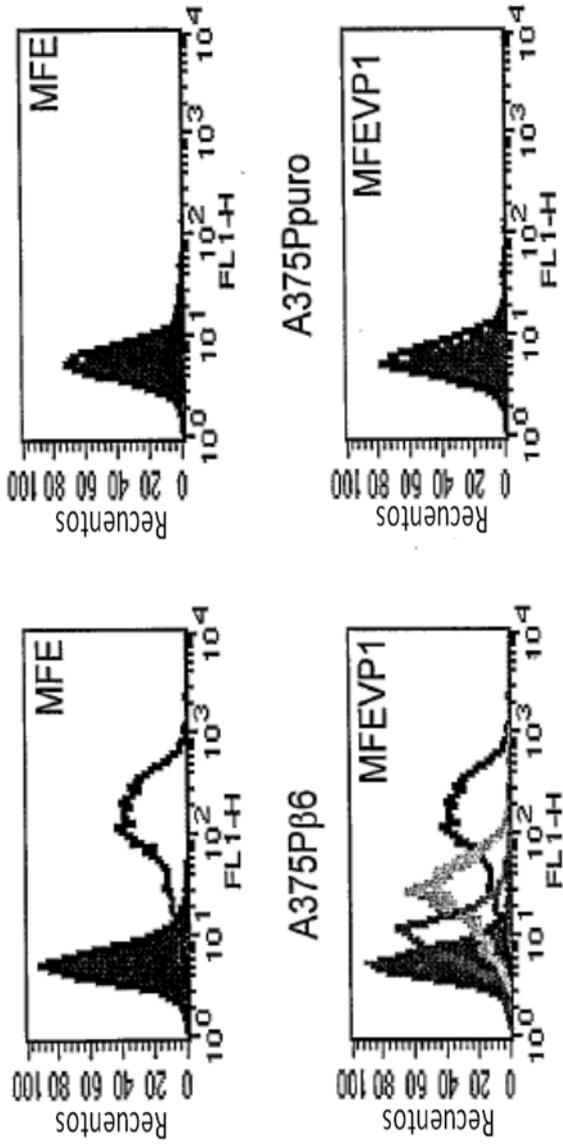


Figura 3b

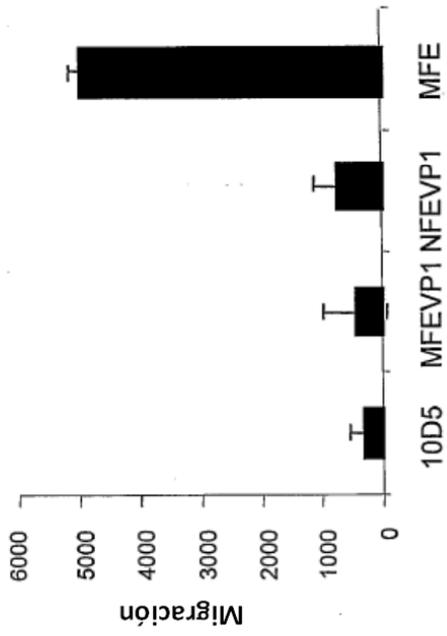


Figura 3c

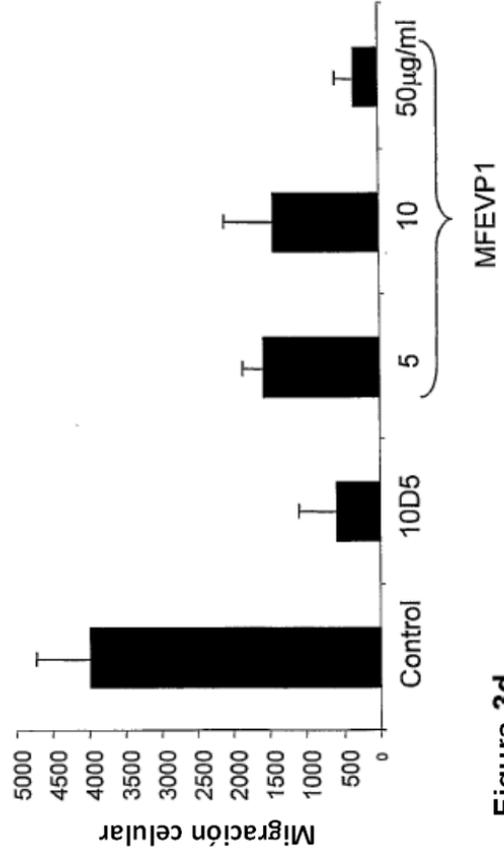


Figura 3d

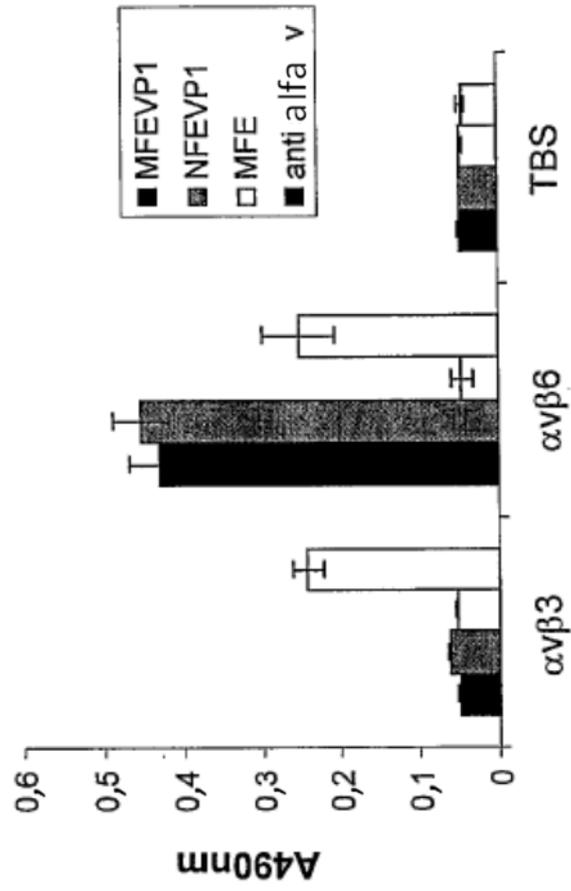


Figura 4a

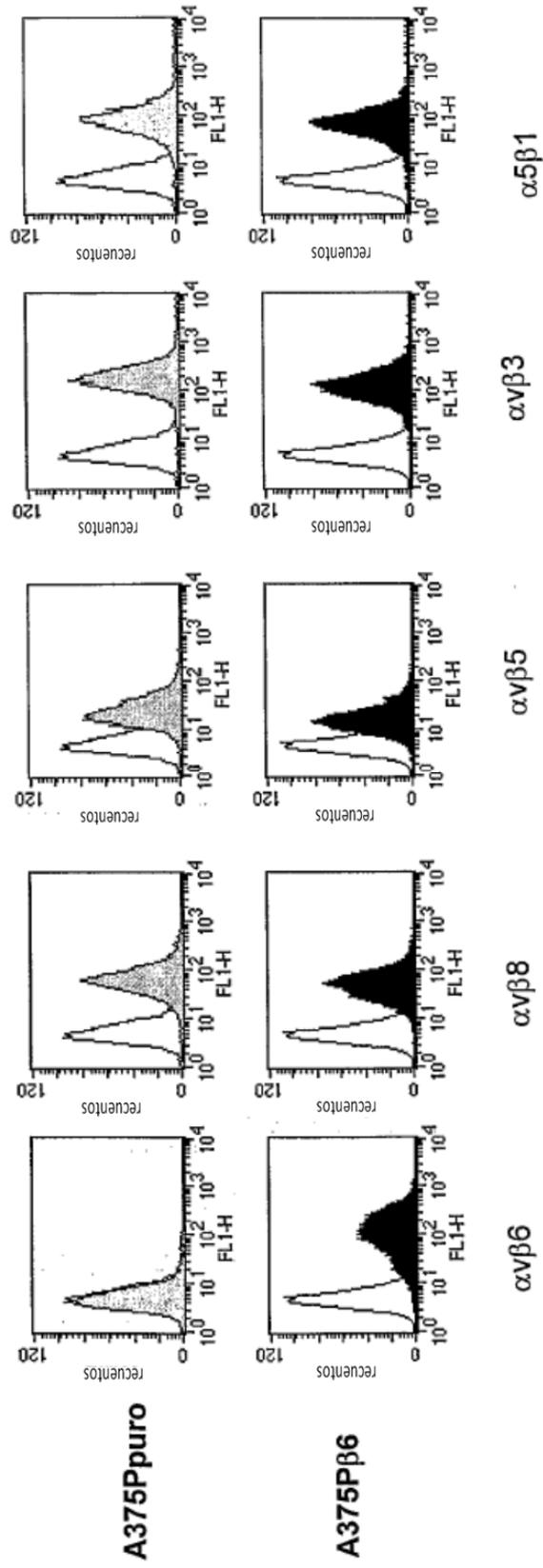


Figura 4b

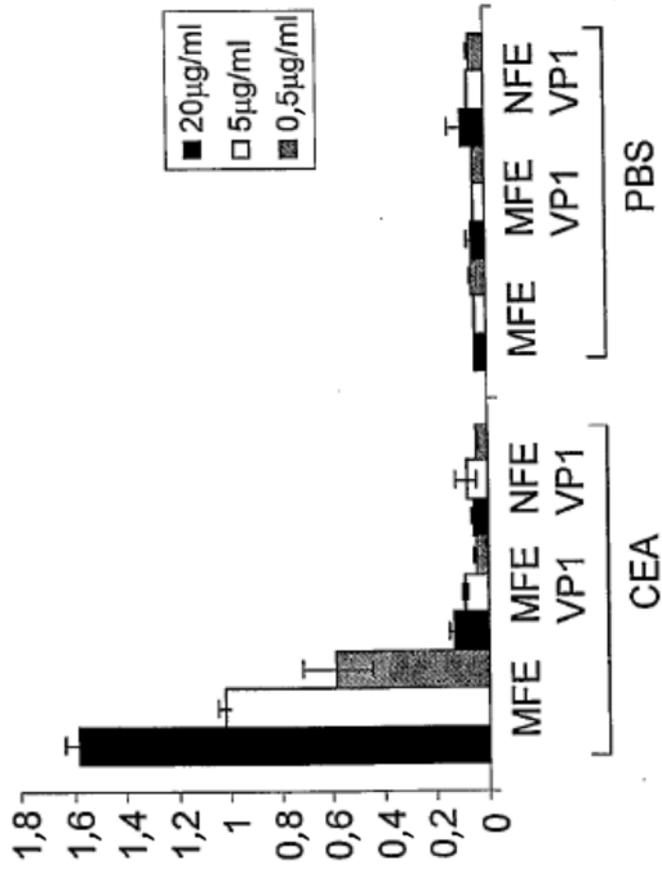


Figura 5a

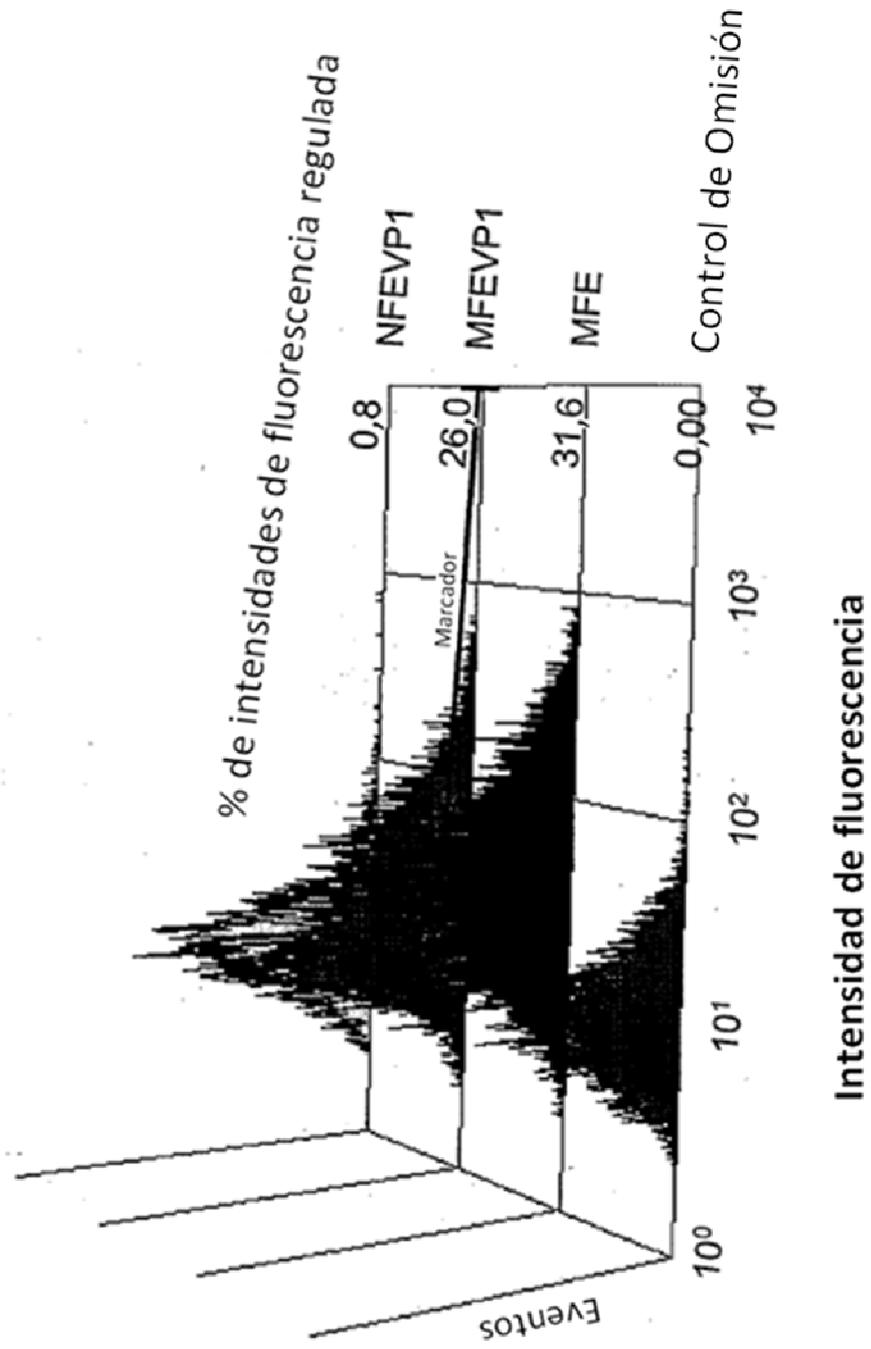


Figura 5b

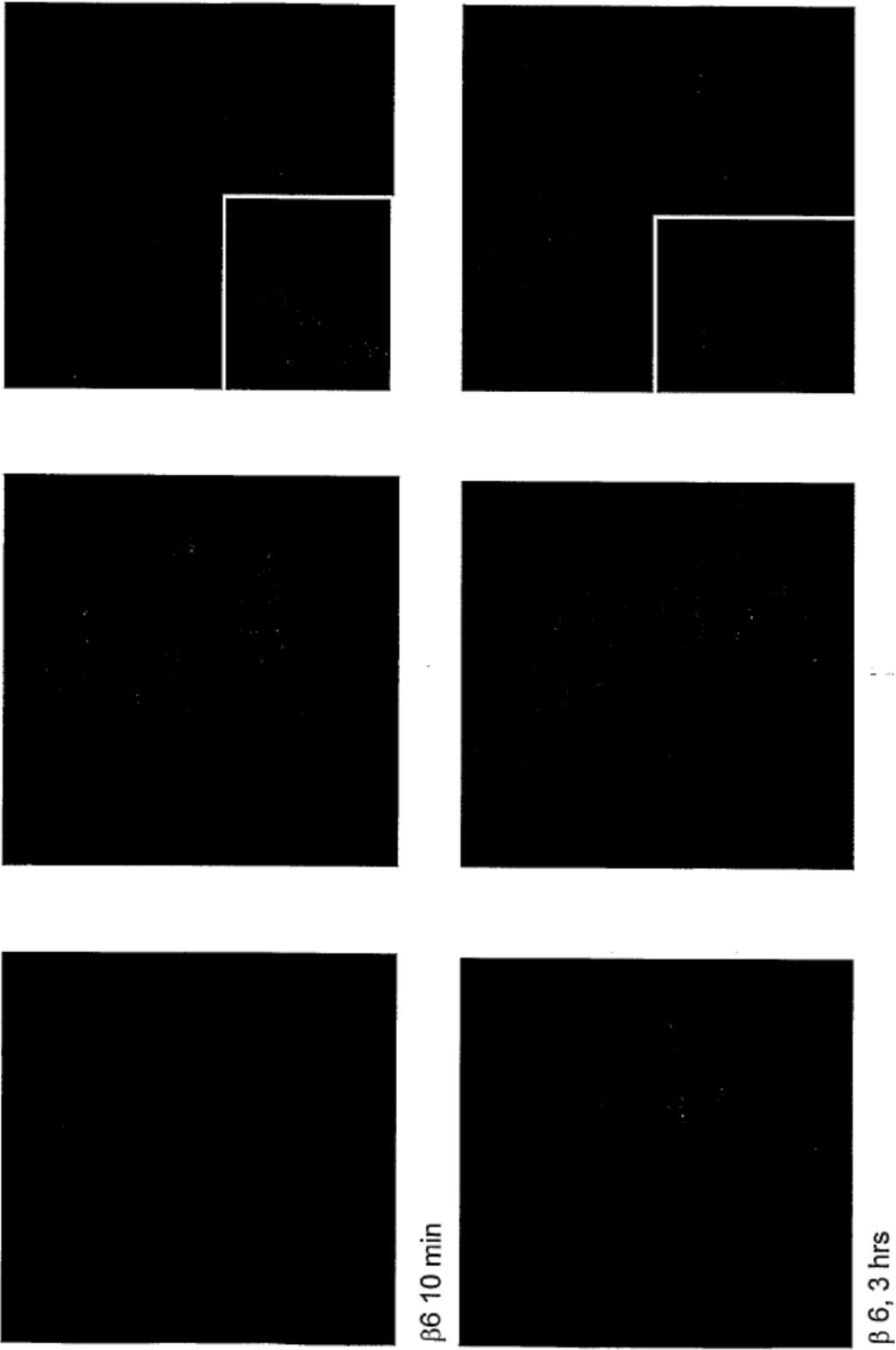
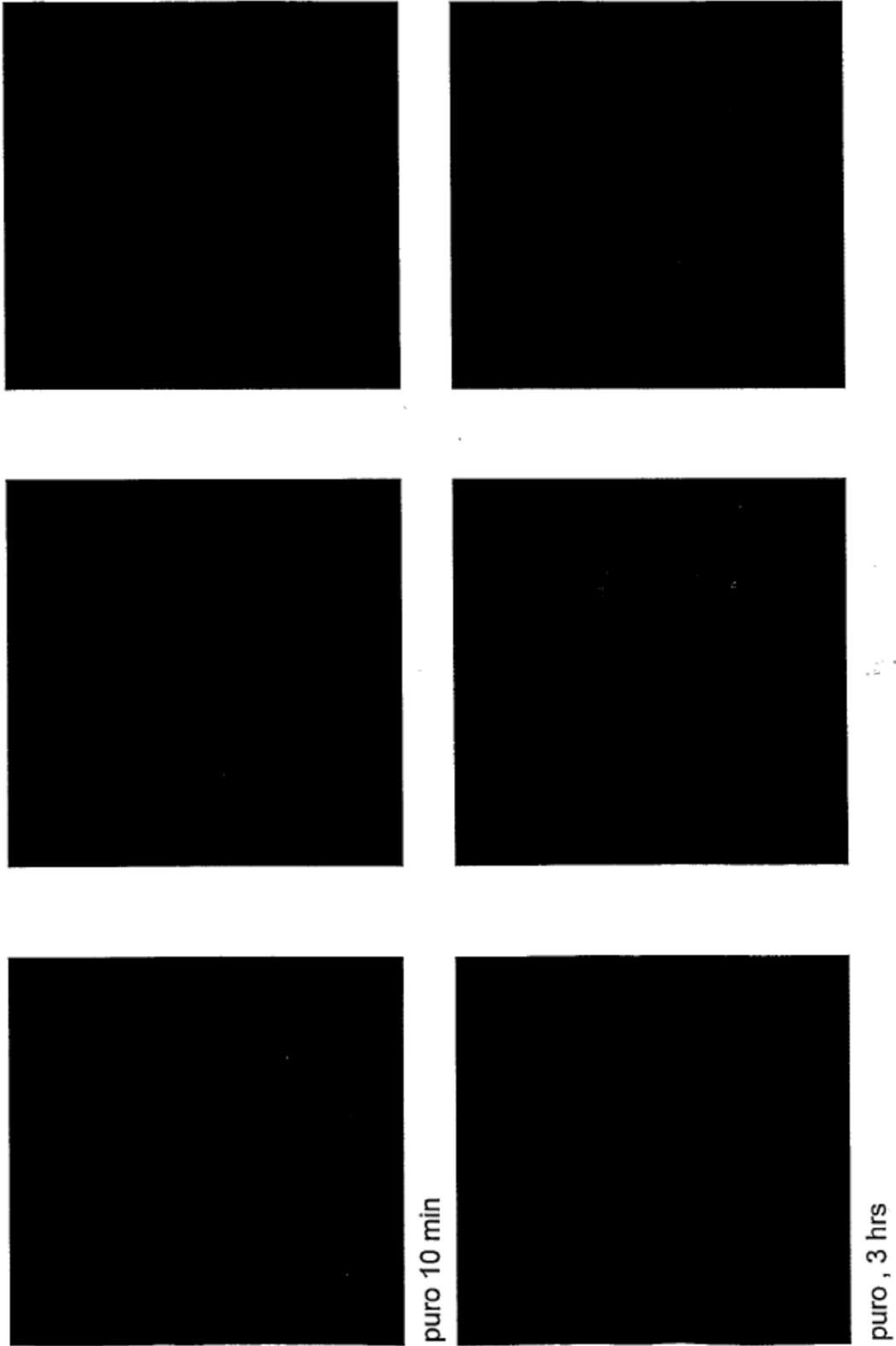
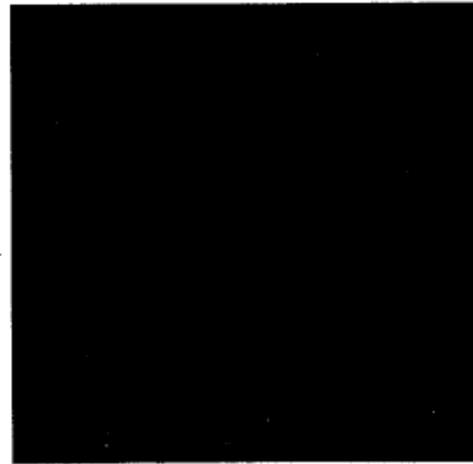
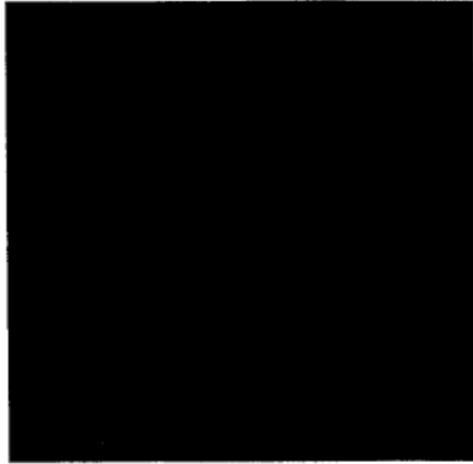


Figura 6





$\beta$ 6, Control

**Figura 6**

Absorbancia (número de onda)<sup>2</sup>

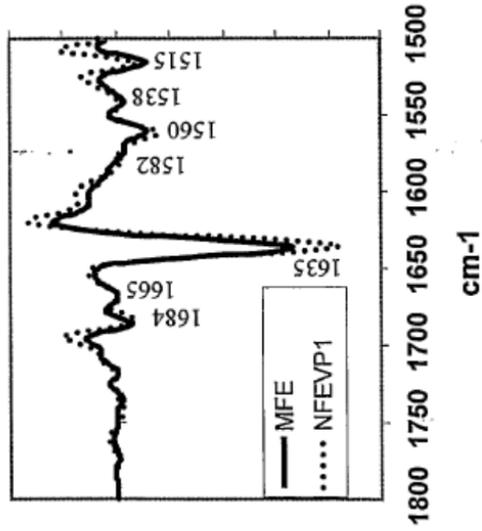


Figura 7(a)

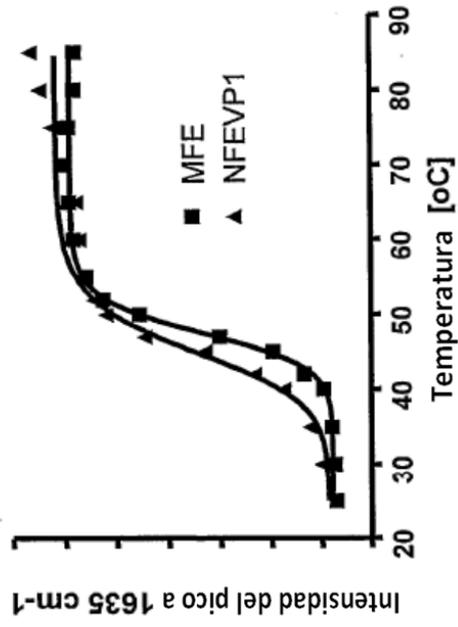


Figura 7(b)

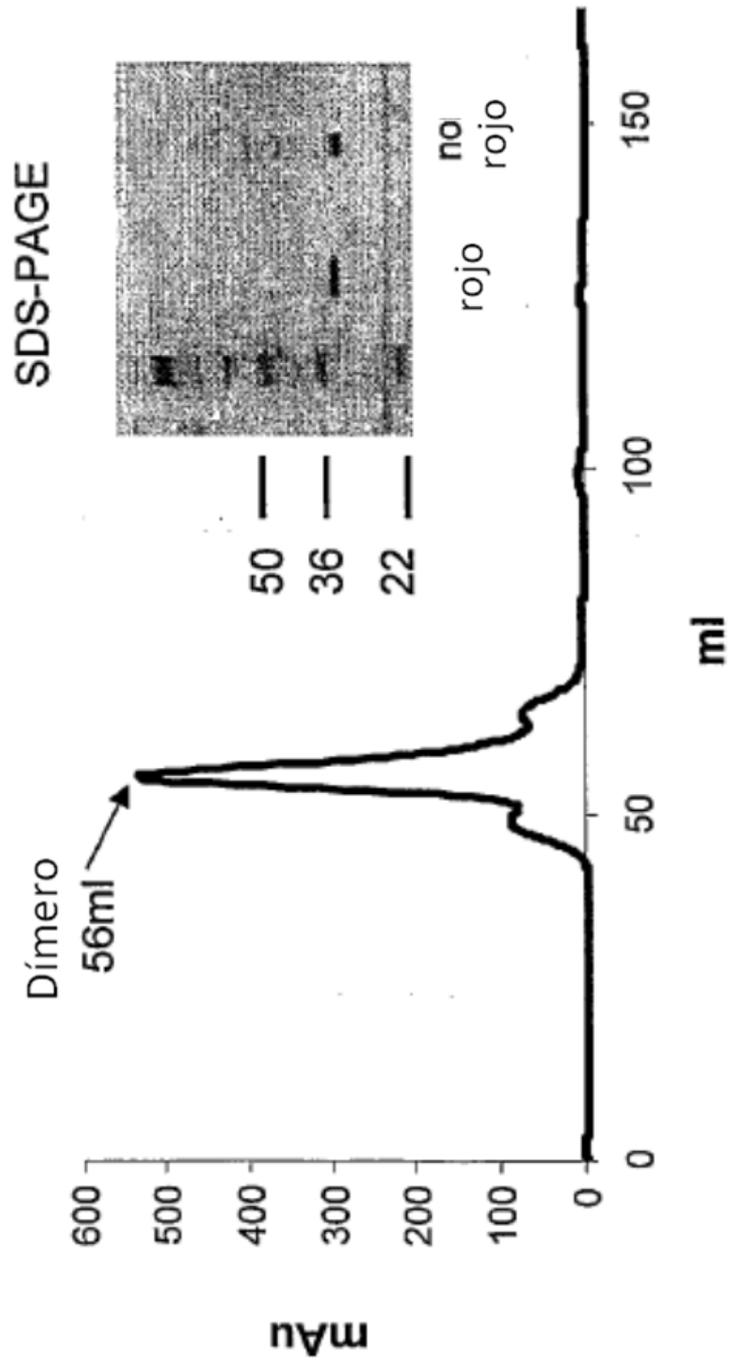


Figura 8(a)

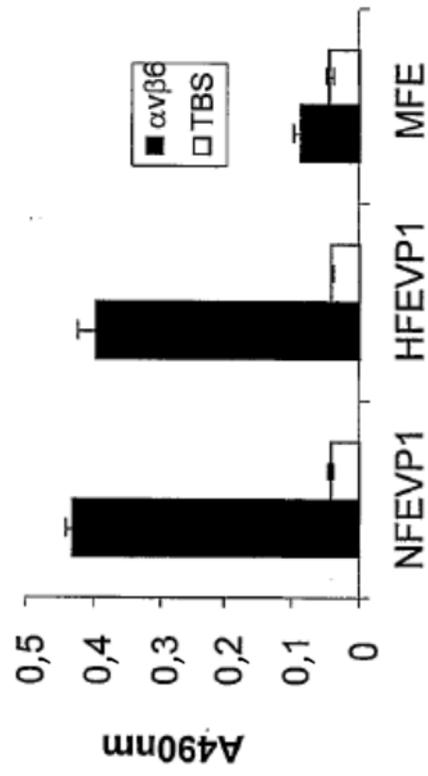


Figura 8(b)

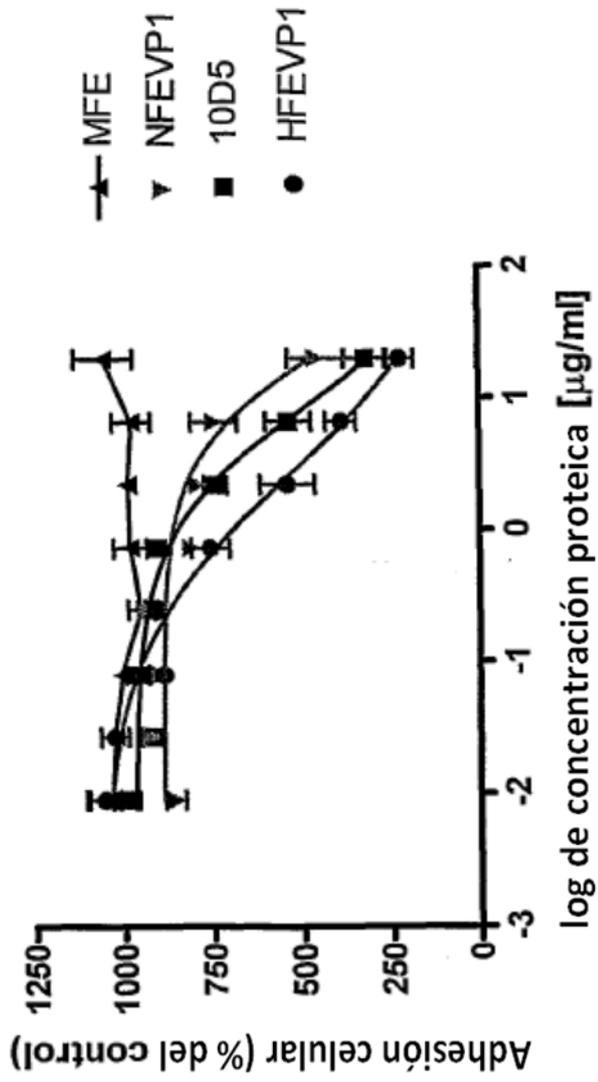


Figura 8(c)

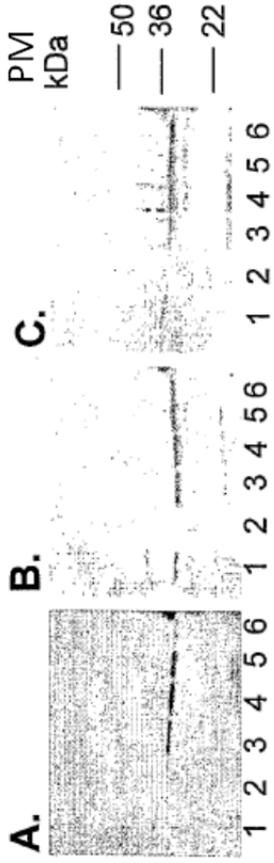


Fig. 9

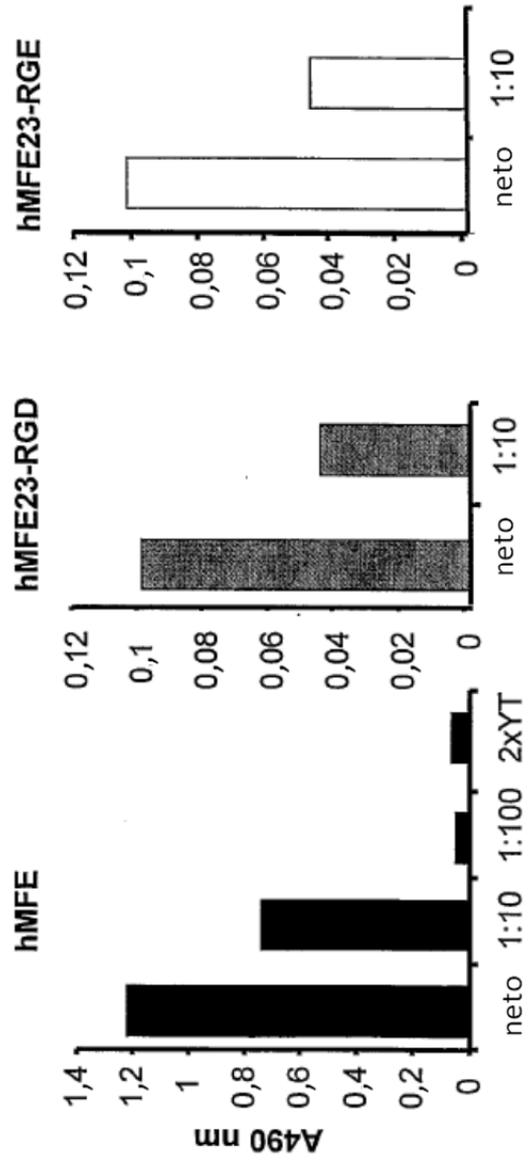


Fig. 10

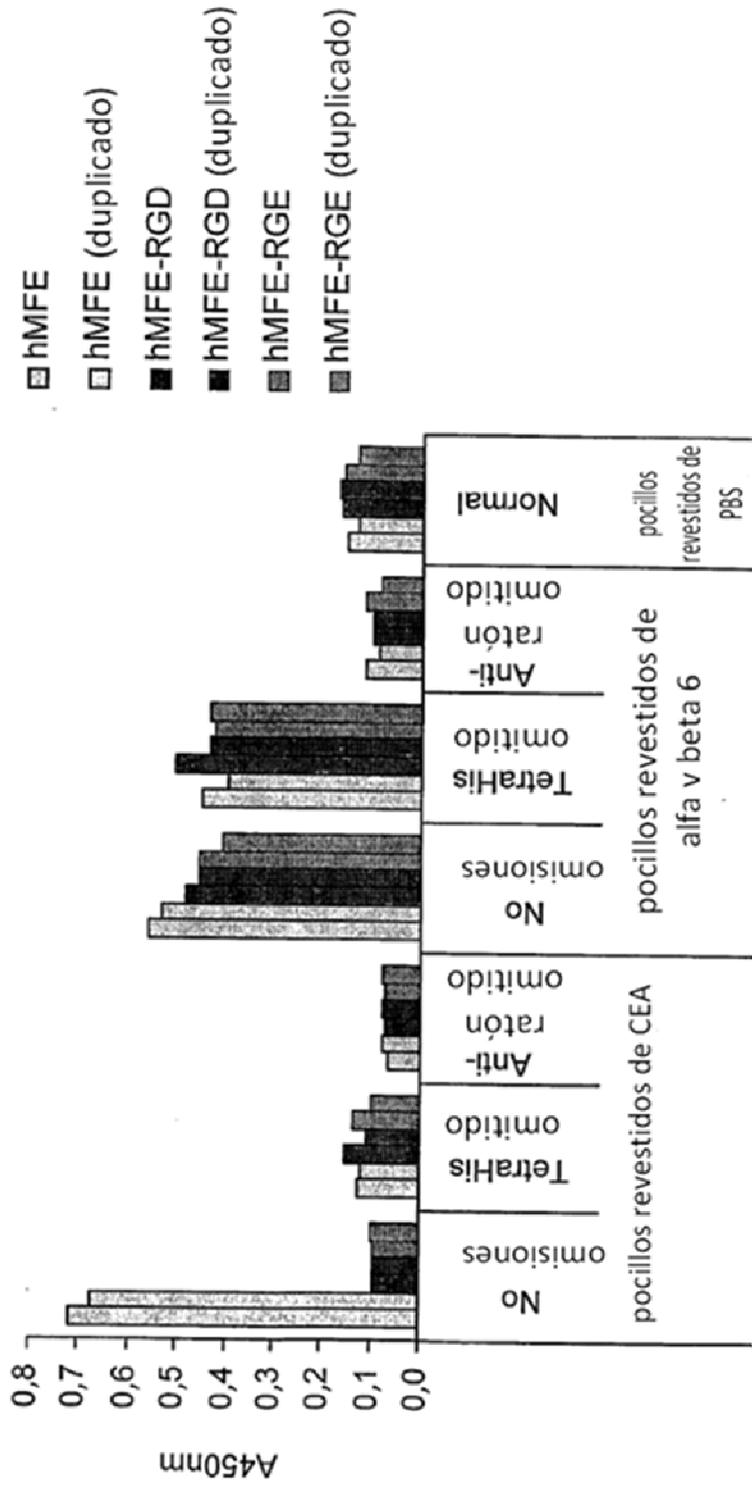


Figura 11.