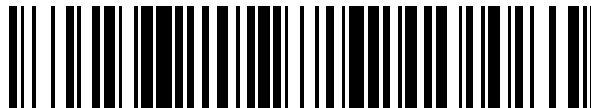


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 053**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2014 PCT/IB2014/000279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14122529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2014 E 14717073 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2953977**

54 Título: **Agente de formación de inmunoiágenes para el uso con la terapia de conjugado de anticuerpo-fármaco**

30 Prioridad:

05.02.2013 US 201361761190 P
21.01.2014 EP 14305082

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

01.03.2018

73 Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

KRUIP, JOCHEN;
SARKAR, SUSANTA, K.;
GEBAUER, MATHIAS;
LANGE, CHRISTIAN y
FOCKEN, INGO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 657 053 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

Agente de formación de inmunomárgenes para el uso con la terapia de conjugado de anticuerpo-fármaco

CAMPO DE LA INVENCÓN

5 La invención se refiere a una proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante y a métodos de uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

Existen una serie de retos en el desarrollo de fármacos para su uso terapéutico en una población de pacientes. Muchos agentes iniciales no alcanzan el mercado por una serie de razones (por ejemplo, no poseen beneficios clínicos o no se ha demostrado su seguridad en una población de pacientes). Algunas cuestiones críticas para el desarrollo de fármacos eficaces y seguros son: (1) establecer que un fármaco interacciona con su objetivo molecular previsto en una población de pacientes; (2) establecer que el objetivo específico es pertinente para el tratamiento de la enfermedad concreta en la misma población de pacientes; y (3) identificar una dosis biológicamente óptima basándose en el efecto del fármaco sobre el objetivo en la misma población de pacientes. El desarrollo de una prueba de diagnóstico acompañante apropiada para un fármaco concreto ayudaría significativamente al desarrollo de un fármaco para su uso en una población de pacientes clínicos.

Una prueba de diagnóstico acompañante junto con la formación de imágenes moleculares proporciona una poderosa evaluación cuatridimensional no invasiva de un objetivo molecular y su interacción con moléculas de fármacos *in vivo*. Algunos ejemplos de plataformas de formación de imágenes incluyen: la formación de imágenes de resonancia magnética (MRI); la tomografía de emisión de positrones (PET); la tomografía de emisión monofotónica (SPECT); la formación de imágenes ópticas, la tomografía computerizada (CT); la formación de imágenes con ultrasonidos, rayos X o fotoacústicas. La selección de un contraste de formación de imágenes considera la sonda molecular específica y las características intrínsecas del tejido. El acoplamiento de una prueba de diagnóstico acompañante con la formación de imágenes moleculares permite una mejor comprensión de la interacción del fármaco concreto con su objetivo molecular en pacientes, que puede ayudar a identificar respondedores potenciales al fármaco específico y ayudar a comprender y determinar los mecanismos de sensibilidad y resistencia del fármaco (y su dosificación óptima).

La solicitud internacional WO 2007/024222 describe el anticuerpo monoclonal anti-CA6 murino DS6 y sus versiones humanizadas, así como un conjugado del mismo con DM4. Se especifica que el anticuerpo puede estar radiomarcado, o marcado con un ion metálico.

30 La solicitud internacional WO 0202781 describe una molécula de diacuerpo que se estabiliza vía los dominios CH1/CL.

La solicitud internacional WO2011028811 describe una proteína de unión multivalente que comprende una cadena polipeptídica, comprendiendo la cadena polipeptídica VD1-(X1)*n*-VD2-C-(X2)*n*, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, C es un dominio constante, X1 representa un aminoácido o polipéptido, X2 representa una región de Fc, y *n* es 0 o 1.

La solicitud internacional WO2011036460 describe proteínas de fusión de anticuerpos con especificidad dual, que comprenden un resto inmunoglobulínico, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', con una primera especificidad por un antígeno de interés, y comprenden además un anticuerpo de un solo dominio con especificidad por un segundo antígeno de interés; en particular, en las que el antígeno primero y el antígeno segundo son entidades diferentes.

40 SUMARIO DE LA INVENCÓN

La materia objeto de la invención se define mediante las reivindicaciones. Se ha desarrollado una proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante basándose en el anticuerpo monoclonal humanizado DS6, para su uso como herramienta de diagnóstico para la detección *in vivo* y la cuantificación del sialoglicotopo de MUC1 asociado a tumor CA6 mediante una técnica de formación de imágenes, tal como la formación de bioimágenes de tomografía de emisión de positrones (PET). La proteína de unión similar a un anticuerpo facilita la estratificación de los pacientes y la evaluación temprana de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado de fármaco-anticuerpo DS6 humanizado huDS6-DM4, que consiste en un anticuerpo monoclonal humanizado contra el sialoglicotopo de MUC1 asociado a tumor CA6, conjugado con el maitansinoide citotóxico DM4.

50 La proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante puede emplearse para identificar pacientes y subpoblaciones de pacientes con una alta expresión de CA6 que puedan responder preferentemente a un tratamiento con un fármaco que se dirija a tejidos (por ejemplo, tejidos tumorales) que presenten una alta expresión de CA6, tales como un conjugado de fármaco-anticuerpo (ADC) que se dirija al epítipo de CA6. El ADC puede ser, por ejemplo, una molécula de huDS6 unida a un agente citotóxico, tal como un derivado de maitansina, tal como DM1 o DM4, u otro agente, tal como se describe en la publicación internacional nº WO 2005/009369. La

proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante puede administrarse antes de la administración del ADC, tal como para determinar si es probable que el sujeto responda a un tratamiento con ADC.

5 La proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante puede emplearse para la detección de CA6 *in vivo* mediante una técnica de formación de bioimágenes, tal como la tomografía de emisión de positrones (PET), y permite unos tiempos de exposición cortos y una rápida formación de imágenes, tal como en 48 a 24 horas o menos, la prueba de diagnóstico acompañante es un ligante muy específico con una cinética de eliminación apropiada.

10 La descripción describe una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6, en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende también un quelante. La proteína de unión similar a un anticuerpo puede emplearse como herramienta de diagnóstico para la detección *in vivo* y la cuantificación del antígeno tumoral CA6 humano mediante una técnica de formación de bioimágenes, tal como PET, en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo está conjugada con un quelante apropiado para el acoplamiento al trazador de formación de bioimágenes.

15 La descripción describe además una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6, en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende también un quelante. La proteína de unión similar a un anticuerpo puede emplearse como un agente de formación de imágenes o de detección para un tejido que exprese el antígeno tumoral CA6, en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo está conjugada con un quelante adecuado para el acoplamiento a un agente.

20 La descripción describe además un método para obtener una proteína de unión similar a un anticuerpo DS6 que comprende secuencias de ADN V_L y V_H respectivas procedentes del anticuerpo DS6 humanizado dispuestas en tándem y separadas por una secuencia enlazadora. Las construcciones DS6 V_L -Enlazador-DS6 V_L y DS6 V_H -Enlazador-DS6 V_H se fusionan a nivel del ADN en el extremo 3' a las secuencias de dominio constante humanas, según las fórmulas [I] y [II] a continuación:

25
$$V_{L1}-L_1-V_{L2}-C_L \quad [I]$$

$$V_{H1}-L_2-V_{H2}-C_{H1} \quad [II]$$

en las que:

V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina basado en DS6;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina basado en DS6;

V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina basado en DS6;

30 V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina basado en DS6;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina IGKC humana;

C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de una inmunoglobulina humana;

35 L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos; y

en el que los polipéptidos de V_{L1} y V_{L2} son el mismo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina basado en DS6 o diferente, y los polipéptidos de V_{H1} y V_{H2} son el mismo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina basado en DS6 o diferente; y en el que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una proteína de unión similar a un anticuerpo de inmunoglobulina en tándem monoespecífica bivalente. Los dominios C_L y C_{H1} se pueden unir, tal como mediante un enlace de disulfuro. Además, los polipéptidos de fórmula I y fórmula II pueden comprender una etiqueta opcional (por ejemplo, una etiqueta de polihistidina o 6x-His).

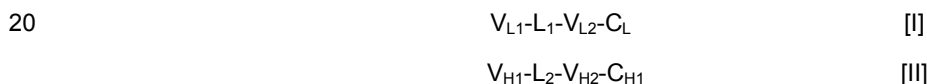
40 La descripción describe también un método para tratar un trastorno, tal como un cáncer en un paciente, que comprende las etapas de obtener el nivel de expresión de CA6 en el paciente, en el que se administra al paciente una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6, en el que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende además un quelante, y realizar una determinación para saber qué tejidos están expresando CA6; y administrar huDS6-DM4 al paciente si el paciente tiene un nivel de expresión de CA6 que es al menos 10% mayor que un nivel de expresión de CA6 en un tejido de referencia, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40% o mayor que la expresión de CA6 en un tejido de referencia.

50 En algunas realizaciones, la proteína de unión similar a un anticuerpo mencionada en la invención se usa para determinar el nivel de expresión de CA6 en un tejido tumoral tal como en un carcinoma ovárico, carcinoma ovárico endometriode, neoplasia del cuello uterino, neoplasia del endometrio, neoplasia de la vulva, carcinoma de mama, tumor pancreático, y tumor del urotelio.

5 La descripción describe un método para determinar si un paciente de cáncer es un candidato para el tratamiento con huDS6-DM4, comprendiendo dicho método las etapas de obtener el nivel de expresión de CA6 en el paciente, en el que una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6 y en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende también un quelante, se administra al paciente, y realizar una determinación sobre si el nivel de expresión de CA6 es al menos 10% mayor que el nivel de expresión de CA6 en un tejido de referencia, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40% o mayor que la expresión de CA6 en un tejido de referencia; y proporcionar una indicación de que el paciente de cáncer es un candidato para el tratamiento con huDS6-DM4 cuando la determinación resulte afirmativa.

10 La descripción describe además un método para controlar la respuesta de un paciente de cáncer al tratamiento con huDS6-DM4, comprendiendo dicho método las etapas de obtener el nivel de expresión de CA6 en el paciente, administrar al paciente una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6 y en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende también un quelante, antes y durante el tratamiento con huDS6-DM4, realizar una determinación sobre si el nivel de expresión de CA6 aumenta, se mantiene o disminuye como resultado del tratamiento con huDS6-DM4; y proporcionar una indicación de que el tratamiento debe continuar si el nivel de expresión de CA6 en el paciente ha disminuido, comparado con el nivel de expresión de CA6 antes del tratamiento con huDS6-DM4.

15 La descripción describe además una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6, en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende dos polipéptidos que tienen las estructuras representadas por las siguientes fórmulas [I] y [II]:



en las que:

V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina basado en DS6;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina basado en DS6;

25 V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina basado en DS6;

V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina basado en DS6;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina IGKC humana;

30 C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de una inmunoglobulina humana;

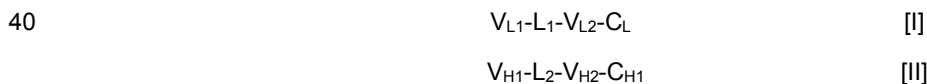
L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos;

en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una proteína de unión similar a un anticuerpo de inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente; y

en la que la proteína similar a un anticuerpo comprende también un quelante.

35 La descripción también describe un método para preparar una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6, en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende además un quelante, que comprende:

(a) expresar en una célula una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que presentan las estructuras representadas por las siguientes fórmulas [I] y [II]:



en las que:

V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina basado en DS6;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina basado en DS6;

45 V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina basado en DS6;

V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina basado en DS6;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina IGKC humana;

C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de una inmunoglobulina humana;

5 L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos;

en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una proteína de unión similar a un anticuerpo de inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente; y

(b) unir la proteína de unión similar a un anticuerpo al quelante.

10 La invención también proporciona un método para tratar tejido enfermo que expresa CA6 en un paciente, que comprende administrar al paciente una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente a CA6 y que comprende también un quelante y un agente de formación de imágenes; identificar el tejido enfermo que expresa CA6 en el paciente mediante formación de imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET); y determinar si el paciente es un candidato para el tratamiento con huDS6-DM4 si la expresión de CA6 en el tejido enfermo es mayor o igual al 10% de la expresión de CA6 en un estándar de referencia.

15 La descripción también proporciona un método para tratar un cáncer positivo a CA6 en un paciente, que comprende las etapas de adquirir información con respecto al nivel de expresión de CA6 en el paciente; y administrar huDS6-DM4 al paciente si el nivel de expresión de CA6 en el paciente es mayor o igual al 10% de la expresión de CA6 en un estándar de referencia.

20 La descripción también proporciona un método para determinar si un paciente de cáncer es un candidato para el tratamiento con huDS6-DM4, que comprende las etapas de adquirir información con respecto al nivel de expresión de CA6 en el paciente; y determinar si el paciente es un candidato para el tratamiento con huDS6-DM4 si la expresión de CA6 en el tejido enfermo es mayor o igual al 10% de la expresión de CA6 en un estándar de referencia.

25 La descripción también proporciona un método para controlar la respuesta de un paciente de cáncer al tratamiento con huDS6-DM4, que comprende las etapas de adquirir información con respecto al nivel de expresión de CA6 en el paciente después de la administración de huDS6-DM4; y proporcionar una indicación de que el tratamiento debe continuar si el nivel de expresión de CA6 en el paciente ha disminuido, comparado con el nivel de expresión de CA6 antes del tratamiento con huDS6-DM4.

30 La invención proporciona una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente al sialoglicotopo de MUC1 asociado a tumor CA6, en la que la proteína de unión similar a un anticuerpo comprende dos polipéptidos que tienen las estructuras representadas por las siguientes fórmulas [I] y [II]:



en las que:

35 V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

40 C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina IGKC humana;

C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de una inmunoglobulina humana;

L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos; y

45 en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una proteína de unión similar a un anticuerpo de inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente, en la que el polipéptido de fórmula [I] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 1, y el polipéptido de fórmula [II] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 7.

La invención también proporciona un método para preparar una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente al sialoglicotopo de MUC1 asociado a tumor CA6, que comprende expresar en una célula una o

más moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen las estructuras representadas por las siguientes fórmulas [I] y [II]:



5 en las que:

V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

10 C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina IGKC humana;

C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de una inmunoglobulina humana;

L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos; y

15 en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una proteína de unión similar a un anticuerpo de inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente; y

en la que el polipéptido de fórmula [I] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 1, y el polipéptido de fórmula [II] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 7.

20 Las realizaciones específicas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Figura 1. Representación esquemática de la proteína de unión similar a un anticuerpo bivalente modificada, un fragmento de inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente (B-Fab). Los ejemplos de proteínas B-Fab incluyen: B-Fab con el enlazador G4SG4S (SEQ ID NO:3) y una etiqueta 6x-His C-terminal, B-Fab con el enlazador G4SG4S (SEQ ID NO:3) sin la etiqueta 6x-His C-terminal, y B-Fab con el enlazador G4S y la etiqueta 6x-His C-terminal.

30 Figura 2. Evaluación del anticuerpo modificado basado en DS6 B-Fab con el enlazador GGGGSGGGGS ((G4S)₂) (SEQ ID NO: 3) y la etiqueta 6x-His C-terminal mediante una electroforesis en gel (Figura 2A), cromatografía de exclusión molecular (SEC) (Figura 2B), y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) (Figura 2C y Figura 2D).

Figura 3. Evaluación del anticuerpo modificado basado en DS6 B-Fab con el enlazador (G4S)₂ mediante una electroforesis en gel (Figura 3A), SEC (Figura 3B), y FACS (Figura 3C y Figura 3D).

35 Figura 4. Evaluación del anticuerpo modificado basado en DS6 B-Fab con el enlazador GGGGS (G4S) y la etiqueta 6x-His C-terminal mediante una electroforesis en gel (Figura 4A), SEC (Figura 4B), y FACS (Figura 4C y Figura 4D).

Figura 5. Evaluación del anticuerpo modificado basado en DS6 B-Fab mediante FACS empleando células A2780 sin DOTA (Figura 5A), células WISH sin DOTA (Figura 5B), y células WISH con DOTA (Figura 5C), que demuestra que la conjugación con DOTA no altera la unión de DS6.

40 Figura 6. Evaluación de la proteína de unión similar a un anticuerpo ⁶⁴Cu-DOTA-DS6 B-Fab que demuestra que el radiomarcado con ⁶⁴Cu y la conjugación con DOTA permite una radioquímica (Figura 6A) y una estabilidad en suero (Figura 6B) ideales.

Figura 7. Comparación entre proteínas de unión similares a anticuerpos que tiene un andamiaje de diacuerpo (Figura 7A) y un andamiaje de B-Fab (Figura 7B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La invención, según se describe en la presente, se refiere a una proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante que se basa en el anticuerpo monoclonal humanizado DS6, que se va a utilizar como herramienta de diagnóstico para la detección *in vivo* y la cuantificación del antígeno tumoral CA6 humano mediante

formación de bioimágenes PET. La proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante facilitará la estratificación de pacientes y la evaluación temprana de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado de fármaco-anticuerpo DS6, huDS6-DM4, que consiste en un anticuerpo monoclonal humanizado contra el sialoglicotopo de MUC1 asociado a tumor CA6, conjugado con el maitansinoide citotóxico DM4. El inmunoconjugado de fármaco-anticuerpo huDS6-DM4 se describe, por ejemplo, en la publicación internacional n° WO 2005/009369. El anticuerpo DS6 y el antígeno tumoral CA6 se describen, por ejemplo, en Kearse et al. (Int J Cancer. 15 de diciembre de 2000; 88(6):866-72).

El huDS6-DM4 es un innovador inmunoconjugado de fármaco-anticuerpo que consiste en un anticuerpo monoclonal humanizado (huDS6) contra el sialoglicotopo de MUC1 asociado a tumor CA6, conjugado con el maitansinoide citotóxico DM4. Las proteínas de mucina desempeñan un papel fundamental en la formación de barreras mucosas protectoras sobre superficies epiteliales, y se expresan sobre la superficie apical de las células epiteliales que tapizan las superficies mucosas de muchos tejidos diferentes, que incluyen pulmón, mama, ovario, estómago y páncreas. Se sabe que la MUC1 (mucina-1) está sobreexpresada en una serie de cánceres epiteliales, y la sobreexpresión de CA6 está relacionada con un comportamiento agresivo en cánceres humanos y un mal desenlace para los pacientes. El CA6 presenta una distribución limitada entre los tejidos de adultos normales, y por tanto, el anticuerpo DS6 se constituye en un agente prometedor para el tratamiento selectivo de tumores positivos a CA6 (por ejemplo, tumores de los ovarios, útero, páncreas, mama o pulmón). Después de la unión del anticuerpo/antígeno y la internalización, el inmunoconjugado huDS6-DM4 libera DM4, que se une a la tubulina y altera la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de los microtúbulos, lo cual produce una detención mitótica de las células tumorales que expresan CA6. El huDS6-DM4 está siendo sometido en la actualidad a un ensayo clínico de fase I en pacientes diagnosticados con tumores sólidos positivos al antígeno CA6.

Para identificar pacientes que muestran la expresión de CA6 en tumores y, por tanto, que pueden responder al tratamiento con huDS6-DM4, se ha desarrollado una herramienta de diagnóstico acompañante que se une a CA6 con una alta afinidad. Además, esta proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante actúa como un marcador temprano de la eficacia, proporcionando una herramienta auxiliar para controlar, de modo no invasivo, la respuesta de un paciente a la terapia con huDS6-DM4, facilitando con ello la estratificación de pacientes en ensayos clínicos o en tratamientos clínicos (es decir, una disminución en la señal de CA6 se correlaciona con un encogimiento del tumor o la infrarregulación del objetivo, acoplado a una eficacia insuficiente). Este diagnóstico acompañante puede reducir el desgaste y ayudar a administrar una medicina eficaz a los pacientes con mayor rapidez. La proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante, según se describe en la presente, también puede utilizarse para la detección de CA6 *in vivo* mediante la formación de bioimágenes PET. Para conseguir unos tiempos de exposición cortos y una formación de imágenes rápida, por ejemplo, en 48 a 24 horas o menos, con una alta señal de tumor a sangre, es necesario un ligante muy específico con la cinética de eliminación apropiada.

Se han desarrollado diferentes proteínas de unión similares a anticuerpos nuevas a partir de la secuencia del anticuerpo DS6, junto con un quelante adecuado y un radiomarcador, para cumplir con los requisitos de la formación de imágenes PET (por ejemplo, mejor penetración en el tumor, una cinética de eliminación más rápida, y una excelente proporción de tumor a sangre). Basándose en un factor de calidad de formación de imágenes (IFOM) predeterminado, se eligió un fragmento de anticuerpo de ~70 kDa (una inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente, denominada B-Fab) para la evaluación de la especificidad y, en último término, la traducción clínica. El formato de B-Fab proporciona las ventajas de: (1) una alta estabilidad frente al estrés térmico (incubación a 42°C durante una semana); (2) alta estabilidad en suero humano (incubación a 37°C durante 24 h); y (3) productividad razonable en cultivo de células provisional (~2 mg/l). Comparados con los anticuerpos de longitud completa (~150 kDa), los fragmentos de anticuerpos (~50-75 kDa) muestran unas velocidades de eliminación renal y de eliminación sanguínea más rápidas, lo cual produce unas proporciones de señal a ruido más altas durante la formación de bioimágenes PET.

La proteína de unión similar a un anticuerpo B-Fab DS6 contiene dos sitios de reconocimiento del antígeno CA6 basados en los sitios de reconocimiento del antígeno CA6 del anticuerpo monoclonal humanizado DS6, y muestra una alta afinidad de unión con el antígeno CA6. Después de la conjugación con un quelante (por ejemplo, DOTA, NOTA, DTPA, o TETA), el DS6 B-Fab se radiomarcó y se usó para experimentos de formación de bioimágenes PET *in vivo*.

Se emplearon metodologías de ADN recombinante convencionales para construir los polinucleótidos que codifican los polipéptidos que forman el anticuerpo para el diagnóstico acompañante (basado en el anticuerpo DS6) de la invención, para incorporar estos polinucleótidos en vectores de expresión recombinantes, y para introducir dichos vectores en células hospedantes. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed.). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante, tal como se llevan a cabo habitualmente en la técnica, o según se describe en la presente. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada con relación a la química analítica, la química orgánica sintética y la química médica y farmacéutica, y los procedimientos y técnicas de laboratorio que implican, son muy conocidos y se emplea habitualmente en la técnica. De modo similar, pueden emplearse técnicas convencionales para la síntesis química, los análisis químicos, la preparación, formulación y administración de productos farmacéuticos, y el tratamiento de pacientes.

1. Definiciones generales

Tal como se emplean según la presente descripción, los siguientes términos y expresiones, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados. A menos que el contexto indique lo contrario, los términos y expresiones en singular incluyen el plural y viceversa.

5 El término "polinucleótido", tal como se emplea en la presente, se refiere a polímeros de ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios con una longitud de al menos 10 nucleótidos. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o una forma modificada de cualquiera de estos tipos de nucleótidos. Estas modificaciones incluyen modificaciones de la base, tales como bromuridina, modificaciones de la ribosa, tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones del enlace internucleotídico, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término "polinucleótido" incluye específicamente formas monocatenarias y bicatenarias del ADN.

10 Un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, o sintético, o alguna de sus combinaciones, que, en virtud de su origen, el polinucleótido aislado: (1) no está asociado con todo o con una porción de un polinucleótido en el que puede encontrarse el polinucleótido aislado en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

15 Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que: (1) está exento de al menos otros polipéptidos con los que se encuentra normalmente, (2) está fundamentalmente exento de otros polipéptidos del mismo origen, por ejemplo, de la misma especie, (3) es expresado por una célula procedente de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente 50% de los polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que está asociado en la naturaleza, (5) no está asociado (mediante una interacción covalente o no covalente) con porciones de un polipéptido con el que el "polipéptido aislado" está asociado en la naturaleza, (6) está asociado operablemente (mediante una interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociado en la naturaleza, o (7) no aparece en la naturaleza. Este polipéptido aislado puede ser codificado por ADN genómico, ADNc, ARNm, u otro ARN, de origen sintético, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente exento de polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que podrían interferir con su uso (terapéutico, de diagnóstico, profiláctico, para investigación, u otros).

20 Tal como se emplea en la presente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos y murinos.

25 La expresión "anticuerpo humano", tal como se emplea en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que sustancialmente se corresponden con secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos se producen en mamíferos no humanos que incluyen, pero no se limitan a roedores, tales como ratones y ratas, y lagomorfos, tales como conejos. En otras realizaciones, los anticuerpos humanos son producidos en células de hibridoma. En todavía otras realizaciones, los anticuerpos humanos se producen de modo recombinante.

30 Los anticuerpos naturales generalmente comprenden un tetrámero. Cada uno de estos tetrámeros generalmente está compuesto por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, y cada pareja presenta una cadena "ligera" de longitud completa (que generalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (que generalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Los términos "cadena pesada" y "cadena ligera", tal como se emplean en la presente, se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tenga secuencia de dominio variable suficiente para conferir especificidad por un antígeno objetivo. La porción amino-terminal de cada cadena ligera y pesada generalmente incluye un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es generalmente responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena generalmente define un dominio constante responsable de la función efectora. Así, en un anticuerpo natural, un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada de longitud completa incluye un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3}), en el que el dominio V_H se encuentra en el extremo amino-terminal del polipéptido, y el dominio C_{H3} se encuentra en el extremo carboxilo-terminal, y un polipéptido de inmunoglobulina de cadena ligera de longitud completa incluye un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L), en el que el dominio V_L se encuentra en el extremo amino-terminal del polipéptido, y el dominio C_L se encuentra en el extremo carboxilo-terminal.

35 Las cadenas ligeras de mamíferos, en particular las cadenas ligeras humanas, se clasifican generalmente como cadenas ligeras kappa y lambda, y las cadenas pesadas humanas se clasifican generalmente como mu, delta, gamma, alfa, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG presenta varias subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. El IgM presenta subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. IgA se subdivide de modo similar en subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, los dominios variables y constantes generalmente están unidos a través de una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la

cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2ª ed., 1989). Las regiones variables de cada pareja de cadena ligera/pesada generalmente forman un sitio de unión al antígeno. Los dominios variables de los anticuerpos naturales generalmente muestran la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas, unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada pareja generalmente están alineadas mediante las regiones de marco, lo cual puede permitir la unión a un epítipo específico. Desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal, ambos dominios variables de cadena ligera y pesada comprenden generalmente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4.

La expresión "Fc nativo", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento que no se une al antígeno que resulta de la digestión de un anticuerpo o que es producido por otros medios, en forma monomérica o multimérica, y que puede contener la región de bisagra. La fuente de la inmunoglobulina original del Fc nativo es preferiblemente de origen humano, y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Las moléculas de Fc nativo están formadas por polipéptidos monoméricos que pueden estar unidos para producir formas dimericas o multiméricas mediante una asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de las moléculas de Fc nativo varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, e IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, e IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por disulfuro que surge de la digestión con papaína de una IgG. La expresión "Fc nativo", tal como se emplea en la presente, es genérica para las formas monoméricas, dimericas y multiméricas.

La expresión "variante de Fc", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula o una secuencia que se ha modificado a partir de un Fc nativo, pero que aún comprende un sitio de unión para el receptor de rescate FcRn (receptor de Fc neonatal). En la técnica se conocen ejemplos de variantes de Fc y su interacción con el receptor de rescate. Así, la expresión "variante de Fc" puede comprender una molécula o una secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que pueden eliminarse porque proporcionan unas características estructurales o una actividad biológica que no es necesaria para las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención. Así, la expresión "variante de Fc" comprende una molécula o una secuencia que carece de uno o más sitios o restos del Fc nativo, o en la que uno o más sitios o restos del Fc se han modificado, que afectan o están implicados en: (1) la formación de enlaces disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula hospedante seleccionada, (3) una heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula hospedante seleccionada, (4) la glicosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor de Fc distinto del receptor de rescate, o (7) una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La expresión "dominio de Fc", tal como se emplea en la presente, incluye Fc nativo y variantes de Fc y secuencias, según se definió anteriormente. Al igual que los variantes de Fc y las moléculas de Fc nativo, la expresión "dominio de Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, digeridas a partir de un anticuerpo completo o producidas por otros medios.

La expresión "proteína de unión similar a un anticuerpo", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula modificada no natural (o recombinante) que se une específicamente a al menos un antígeno objetivo. Incluye, por ejemplo, un fragmento F(ab), fragmentos F(ab') y diacuerpos.

En ciertos aspectos, la "proteína de unión similar a un anticuerpo" comprende las respectivas secuencias de ADN de V_L y V_H procedentes de un anticuerpo dispuestas en tándem y separadas por una secuencia corta de enlazador de aminoácidos, según las siguientes fórmulas [I] y [II]:

$$V_{L1}-L_1-V_{L2}-C_L \quad [I]$$

$$V_{H1}-L_2-V_{H2}-C_{H1} \quad [II]$$

en las que:

V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina;

L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos; y

en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un fragmento Fab (un fragmento de inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente).

En ciertos aspectos, V_{L1} y V_{L2} son polipéptidos idénticos, y en ciertos aspectos, V_{H1} y V_{H2} son polipéptidos idénticos.

En ciertos aspectos, o típicamente, los dominios C_L y C_{H1} están enlazados mediante un enlace de disulfuro.

5 En ciertos aspectos, cada uno de L_1 y L_2 tiene una longitud de al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos.

En ciertos aspectos, cada uno de L_1 y L_2 es GGGGS o GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3).

En ciertos aspectos, el polipéptido de fórmula [I] comprende una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:1.

10 En ciertos aspectos, el polipéptido de fórmula [II] comprende una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO:7.

En ciertos aspectos, dicha proteína de unión similar a un anticuerpo comprende además al menos un radiomarcador, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico, o un agente de diagnóstico.

En ciertos aspectos, dicha proteína de unión similar a un anticuerpo tiene una actividad específica de al menos 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5 Ci/ μ moles.

15 En ciertos aspectos, dicha proteína de unión similar a un anticuerpo puede tener una K_d aparente como máximo de 8, 7, 6, 5 o 4 nM cuando la unión se mide mediante FACS, por ejemplo, con una proteína de unión similar a un anticuerpo libre.

En ciertos aspectos, dicha proteína de unión similar a un anticuerpo presenta una alta estabilidad al estrés térmico. De modo más específico, puede perderse menos del 25, 20, 15, 10 o 5% de proteína de unión similar a un anticuerpo soluble después de una incubación a 42°C durante una semana.

20 En ciertos aspectos, dicha proteína de unión similar a un anticuerpo presenta una alta estabilidad en suero humano. De modo específico, al menos 70, 75, 80, 85, 90 o 95% de la proteína de unión similar a un anticuerpo puede ser monomérica después de una incubación a 37°C durante 24 horas en suero humano.

25 Una proteína de unión similar a un anticuerpo "aislada" es una proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para la proteína de unión similar a un anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, la proteína de unión similar a un anticuerpo estará purificada: (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo, según se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente en más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente como para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o una secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras empleando tinción de azul de Coomassie o, preferiblemente, de plata. Las proteínas de unión similares a anticuerpos aisladas incluyen la proteína de unión similar a un anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural de la proteína de unión similar a un anticuerpo no estará presente.

30 Las expresiones "sustancialmente puro" o "sustancialmente purificado", tal como se emplean en la presente, se refieren a un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar, la que es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En algunas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie comprende al menos aproximadamente 50% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En todavía otras realizaciones, la especie se purifica hasta una homogeneidad fundamental (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales), en la que la composición consiste fundamentalmente en especies macromoleculares individuales.

40 El término "antígeno" o la expresión "antígeno objetivo", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula, o a una porción de una molécula, que es capaz de ser unida por un anticuerpo o por una proteína de unión similar a un anticuerpo, y que además es capaz de ser empleada en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de este antígeno. Un antígeno objetivo puede tener uno o más epítopos. Con respecto a cada antígeno objetivo reconocido por una proteína de unión similar a un anticuerpo, la proteína de unión similar a un anticuerpo es capaz de competir con un anticuerpo intacto que reconozca al antígeno objetivo. Se entiende que una proteína de unión similar a un anticuerpo "bivalente", distinta de una proteína de unión similar a un anticuerpo "multiespecífica" o "multifuncional", comprende sitios de unión al antígeno que tienen especificidad antigénica idéntica.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional generalmente es un anticuerpo híbrido artificial que presenta dos parejas de cadena pesada/cadena ligera diferentes y dos sitios de unión o epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos mediante una diversidad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, fusión de hibridomas o enlace de fragmentos F(ab').

- 5 Un fragmento F(ab), también denominado Fab, generalmente incluye una cadena ligera y los dominios V_H y C_{H1} de una cadena pesada, en el que la porción de cadena pesada V_H-C_{H1} del fragmento F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otro polipéptido de cadena pesada. Tal como se emplea en la presente, un fragmento F(ab) también puede incluir una cadena ligera que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácidos y una cadena pesada que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácidos y un dominio
- 10 C_{H1}. Un fragmento F(ab) también puede incluir un enlace disulfuro entre C_L y C_{H1}.

Un fragmento F(ab') generalmente incluye una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene más de la región constante (entre los dominios C_{H1} y C_{H2}), de modo que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula de F(ab')₂.

- 15 Un "diacuerpo" generalmente es un dímero de dos fragmentos variables monocatenarios (scFv) que consisten cada uno en las regiones variables de cadena pesada (V_H) y variables de cadena ligera (V_L) conectadas por un pequeño enlazador peptídico que es demasiado corto como para que las dos regiones variables se plieguen juntas, lo cual obliga a los scFv a dimerizarse.

- 20 Las expresiones "propiedad biológica", "característica biológica", y el término "actividad", con referencia a una proteína de unión similar a un anticuerpo de la invención, se emplean de modo intercambiable en la presente e incluyen, pero no se limitan a, la afinidad y la especificidad por un epítomo, la capacidad de antagonizar la actividad del antígeno objetivo (o del polipéptido objetivo), la estabilidad *in vivo* de la proteína de unión similar a un anticuerpo, y las propiedades inmunogénicas de la proteína de unión similar a un anticuerpo. Otras características o propiedades biológicas identificables de una proteína de unión similar a un anticuerpo incluyen, por ejemplo,
- 25 reactividad cruzada (es decir, con homólogos no humanos del antígeno objetivo, o con otros antígenos objetivo o tejidos, en general), y la capacidad para conservar unos altos niveles de expresión de la proteína en células de mamífero. Las características o propiedades mencionadas anteriormente pueden ser observadas o medidas empleando técnicas reconocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasmones de superficie, ensayos de neutralización *in vitro* e *in vivo*, e inmunohistoquímica con secciones de tejidos procedentes de fuentes diferentes, que incluyen seres humanos, primates, o cualquier otra
- 30 fuente que sea necesaria.

La expresión "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", tal como se emplea en la presente, se refiere a un fragmento polipeptídico que contiene al menos las CDR de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulina a partir de la cual procede el fragmento polipeptídico. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional es capaz de unirse a un antígeno objetivo.

- 35 Una proteína de unión similar a un anticuerpo "neutralizante", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula que es capaz de bloquear o reducir sustancialmente una función efectora de un antígeno objetivo con el cual se une. Tal como se emplea en la presente, "reduce sustancialmente" significa una reducción de al menos aproximadamente 60%, preferiblemente al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, aún más preferiblemente al
- 40 menos aproximadamente 85%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de una función efectora del antígeno objetivo.

- El término "epítomo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante polipeptídico, capaz de unirse específicamente con una inmunoglobulina o un receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítomo incluyen agrupamientos sobre la superficie de moléculas químicamente activos, tales como aminoácidos,
- 45 cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítomo es una región de un antígeno a la cual se une un anticuerpo o una proteína de unión similar a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se afirma que una proteína de unión similar a un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente a su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.
- 50 En realizaciones preferidas, se afirma que una proteína de unión similar a un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-8}$ M, más preferiblemente cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-9}$ M, y lo más preferiblemente cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-10}$ M.

- La constante de disociación (K_D) de una proteína de unión similar a un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo,
- 55 mediante resonancia de plasmones de superficie. En general, un análisis de resonancia de plasmones de superficie mide las interacciones de unión a tiempo real entre un ligando (un antígeno objetivo sobre una matriz biodetectora) y un analito (una proteína de unión similar a un anticuerpo en disolución) mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR) empleando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). El análisis de plasmones de superficie también puede realizarse inmovilizando el analito (una proteína de unión similar a un anticuerpo sobre una

matriz biodetectora) y presentando el ligando (antígeno objetivo). El término “ K_D ”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la constante de disociación de la interacción entre una proteína de unión similar a un anticuerpo concreta y un antígeno objetivo.

5 La expresión “se une específicamente”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la capacidad de una proteína de unión similar a un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, para unirse a un antígeno que contiene un epítipo con una K_D de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o mayor, y/o para unirse a un epítipo con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

10 El término “enlazador”, tal como se emplea en la presente, se refiere a uno o más restos de aminoácidos insertados entre dominios de inmunoglobulina para proporcionar una movilidad suficiente a los dominios de las cadenas ligera y pesada para que puedan plegarse y formar inmunoglobulinas de región variable dual cruzada. Los ejemplos no limitantes incluyen enlazadores de glicina/serina, tales como GGGGS o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3), y enlazadores de glicina/alanina. Un enlazador se inserta en la zona de transición entre dominios variables o entre dominios variables y constantes, respectivamente, al nivel de la secuencia. La zona de transición entre los dominios puede identificarse porque los tamaños aproximados de los dominios de inmunoglobulinas son conocidos. La localización precisa de una zona de transición de dominio puede determinarse localizando los tramos peptídicos que no forman elementos de la estructura secundaria, tales como láminas beta o hélices alfa, según se demuestra por medio de datos experimentales, o como puede suponerse empleando técnicas de formación de modelos o de predicción de la estructura secundaria. Los enlazadores son independientes pero, en algunos casos, pueden tener la misma secuencia y/o longitud. Los enlazadores de aminoácidos ejemplares son conocidos en la técnica y resultan adecuados para los usos descritos en la presente.

15 El término “etiqueta”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier molécula enlazada o secuencia basada en afinidad fusionada, habitualmente en el marco, a cualquier posición (generalmente en el extremo N-terminal o C-terminal) de un polipéptido o una proteína de unión similar a un anticuerpo. La presencia de una etiqueta adecuada puede servir para mejorar la detección, la purificación u otras características de la proteína similar a un anticuerpo. Las etiquetas basadas en la afinidad adecuadas incluyen cualquier secuencia que pueda unirse específicamente a otro resto (los ejemplos no limitantes incluyen polihistidina, 6x-histidina, FLAG, V5, biotina, HA, GST o MBP). En algunos casos, una molécula enlazada puede ser un indicador emisor de luz que puede incluir cualquier dominio que pueda indicar la presencia de un polipéptido. Los dominios indicadores emisores de luz adecuados incluyen la luciferasa, proteínas fluorescentes o sus variantes emisores de luz.

20 El término “vector”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) que se emplea para transferir información codificadora a una célula hospedante. El término “vector” incluye una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar a otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a una molécula de ADN bicatenaria circular en la que pueden insertarse otros segmentos de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden insertarse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en la célula hospedante en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de la replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedante tras su introducción en la célula hospedante, y allí se replican junto con el genoma del hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes con los que están unidos operablemente. Estos vectores se denominan en la presente “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante a menudo se encuentran en forma de plásmidos. Los términos “plásmido” y “vector” pueden emplearse de modo intercambiable en la presente, puesto que un plásmido es la forma de vector que se emplea de modo más habitual. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus, y virus adenoasociados), que tengan funciones equivalentes.

25 La expresión “unido operablemente”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una disposición de secuencias flanqueantes, en la que las secuencias flanqueantes descritas se configuran o se ensamblan para realizar su función habitual. Así, una secuencia flanqueante enlazada operablemente a una secuencia codificadora puede ser capaz de realizar la replicación, la transcripción y/o la traducción de la secuencia codificadora. Por ejemplo, una secuencia codificadora está enlazada operablemente a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esa secuencia codificadora. No es necesario que una secuencia flanqueante esté contigua a la secuencia codificadora, siempre que actúe correctamente. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas, pero transcritas, entre una secuencia de promotor y la secuencia codificadora, y la secuencia de promotor aún puede considerarse que está “enlazada operablemente” a la secuencia codificadora.

30 La expresión “célula hospedante recombinante” (o “célula hospedante”), tal como se emplea en la presente, se refiere a una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Una célula hospedante recombinante o una célula hospedante se refieren no solo a la célula mencionada en concreto, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debidas a mutaciones o influencias ambientales, es posible que esta progenie, de hecho, no sea idéntica a la célula

de origen, pero estas células siguen incluyéndose en el alcance de la expresión “célula hospedante”, tal como se emplea en la presente. Puede utilizarse una amplia diversidad de sistemas de expresión de células hospedantes para expresar las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención, que incluyen sistemas de expresión bacterianos, de levadura, baculovirales y de mamífero (así como sistemas de expresión de presentación de fagos).

5 Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19. Para expresar una proteína de unión similar a un anticuerpo de modo recombinante, una célula hospedante se transforma o se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas polipeptídicas de la proteína de unión similar a un anticuerpo, de modo que las cadenas polipeptídicas se expresen en la célula hospedante y, preferiblemente, sean segregadas hacia el medio en el que se cultivan las células hospedantes, a partir del cual puede recuperarse la proteína de unión similar a un anticuerpo.

El término “transformación”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para que contenga un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente partiendo de su estado nativo. Después de la transformación, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula mediante su integración física en un cromosoma de la célula, o puede ser mantenido de forma transitoria como un elemento episómico sin que sea replicado, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de modo estable cuando el ADN se replica con la división de la célula. El término “transfección”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula, y una célula ha sido “transfectada” cuando el ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana celular. En la técnica se conocen una serie de técnicas de transfección. Estas técnicas pueden emplearse para introducir una o más moléculas de ADN exógeno en células hospedantes adecuadas.

La expresión “de origen natural”, tal como se emplea y se aplica a un objeto en la presente, se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza y aún no ha sido manipulado por el ser humano. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se puede aislar a de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el ser humano es de origen natural. De modo similar, “de origen no natural”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un objeto que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o que ha sido sintetizado por el ser humano.

Tal como se emplea en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas se ajustan a su utilización convencional. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales, tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alkilaminoácidos, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden resultar componentes adecuados para las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxil-lisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos empleada en la presente, la dirección hacia la izquierda es la dirección hacia el amino-terminal, y la dirección hacia la derecha es la dirección hacia el carboxilo-terminal, según la convención y el uso convencional.

Los restos de origen natural pueden dividirse en clases basándose en las propiedades comunes de sus cadenas laterales:

40 (1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;

(2) hidrófilos polares: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;

(3) alifáticos: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;

(4) hidrófobos alifáticos: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;

(5) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

45 (6) ácidos: Asp, Glu;

(7) básicos: His, Lys, Arg;

(8) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; y

(10) hidrófobos aromáticos: Phe, Trp, Tyr.

50 Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden implicar intercambiar un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden incluir restos de aminoácidos no naturales, que generalmente se incorporan mediante síntesis peptídica sintética y no mediante síntesis en sistemas biológicos. Éstos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de

aminoácidos. Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las variantes adecuadas de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión similares a anticuerpos de la invención empleando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden identificar áreas adecuadas de una cadena polipeptídica que pueden cambiarse sin destruir la actividad localizando regiones que se cree que no son importantes para la actividad. Como alternativa, los expertos en la técnica pueden identificar restos y porciones de las moléculas que están conservados entre polipéptidos similares. Además, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica ni afectar de modo adverso a la estructura del polipéptido.

El término “quelante” describe un compuesto químico en forma de un anillo heterocíclico que puede contener un metal coordinado con al menos dos iones no metálicos. La presencia de restos quelantes de cationes de ácidos duros en la proteína de unión similar a un anticuerpo ayuda a asegurar la rápida eliminación *in vivo* del compuesto para el diagnóstico acompañante.

Los quelantes se unen covalentemente al anticuerpo o a la proteína de unión similar a un anticuerpo empleando métodos convencionales de bioconjugación. Los restos que contienen amina (por ejemplo, lisina o el N-terminal) del anticuerpo forman un enlace amida con un quelante que contiene un éster activado (por ejemplo, un éster *N*-hidroxisuccinimidílico). Los restos que contienen azufre (por ejemplo, cisteína) se conjugan con quelantes que contienen un éster activado o un resto de maleimida. Como alternativa, los bioconjugados se forman cuando restos de carboxilato activados en el anticuerpo forman una amida o tioéster con grupos amina o tiol, respectivamente, del quelante. Se emplean enlazadores bifuncionales tales como, por ejemplo PEG-maleimida (PEG-Mal), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) o 3-(2-piridiltio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) cuando es necesario.

Los quelantes se eligen por sus propiedades de unión a metales, y pueden cambiarse a voluntad. Pueden emplearse quelantes tales como NOTA (ácido 1,4,7-triaza-ciclononan-*N,N,N'*-triacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclodecan-1,4,7,10-tetraacético), DTPA (ácido 1,1,4,7,7-dietilentriaminapentaacético), y TETA (ácido p-bromoacetamidobenciltetraetilaminatetraacético), con una diversidad de radiomarcadores, radionúclidos, radioisótopos, metales y radiometales. Los quelantes de tipo DOTA, cuando el ligando incluye funciones quelantes de bases fuertes, tales como grupos carboxilato o amina, son los más eficaces para quelar cationes de ácidos duros, en especial cationes de metales del Grupo IIa y del Grupo IIIa. Estos complejos de metal-quelato pueden hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Además, puede conjugarse más de un tipo de quelante con la construcción objetivo para unir múltiples iones metálicos, por ejemplo, radionúclidos de diagnóstico y/o radionúclidos terapéuticos.

Los radiomarcadores, radionúclidos o radioisótopos de diagnóstico particularmente útiles que pueden unirse a los agentes quelantes del anticuerpo o de la proteína de unión similar a un anticuerpo modificada incluyen, pero no se limitan a, ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{188}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$, ^{83}Sr , u otros emisores de rayos gamma, beta, o de positrones. Los radiomarcadores de diagnóstico incluyen una energía de descomposición en el intervalo de 25 a 10.000 keV, más preferiblemente en el intervalo de 25 a 4.000 keV, y aún más preferiblemente en el intervalo de 20 a 1.000 keV, y aún más preferiblemente en el intervalo de 70 a 700 keV. Las energías de descomposición totales de los radionúclidos emisores de positrones útiles son preferiblemente < 2.000 keV, más preferiblemente menores que 1.000 keV, y lo más preferiblemente < 700 keV. Los radiomarcadores útiles como agentes de diagnóstico que emplean la detección por rayos gamma incluyen, pero no se limitan a: Cr-51, Co-57, Co-58, Fe-59, Cu-67, Ga-67, Se-75, Ru-97, Tc-99m, In-111, In-114m, I-123, I-125, I-131, Yb-169, Hg-197, y Tl-201. Las energías de descomposición de los radiomarcadores emisores de rayos gamma útiles son preferiblemente de 20 a 2000 keV, más preferiblemente de 60 a 600 keV, y lo más preferiblemente de 100 a 300 keV.

El término “paciente”, tal como se emplea en la presente, incluye, pero no se limita a, sujetos humanos y animales.

Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría de un tratamiento que emplee el anticuerpo o la proteína de unión similar a un anticuerpo modificada de la invención. “Trastorno” y “afección” se emplean de modo intercambiable en la presente e incluyen trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen a un paciente al trastorno en cuestión. En ciertos aspectos, el trastorno es un cáncer, tal como un cáncer de tumor sólido. En ciertos aspectos específicos, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma ovárico, cáncer endometrial, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, cáncer de riñón, un cáncer del sistema linfático, un sarcoma o un carcinoma en el que se expresa CA6, u otro cáncer que aún deba determinarse, en el que el glicotopo CA6 se exprese predominantemente. El cáncer puede ser, por ejemplo, un carcinoma ovárico seroso, carcinoma ovárico endometriode, neoplasia del cuello uterino, neoplasia del endometrio, neoplasia de la vulva, carcinoma de mama, tumor pancreático, y tumor del urotelio.

5 Cualquier trastorno que pueda tratarse mediante la destrucción de poblaciones de células seleccionadas es adecuado para su uso con las proteínas de unión similares a anticuerpos descritas en la presente, tal como un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, tal como lupus sistémico, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple; el rechazo de injertos, tal como el rechazo a un trasplante renal, el rechazo a un trasplante de hígado, el rechazo a un trasplante de pulmón, el rechazo a un trasplante cardíaco, y el rechazo a un trasplante de médula ósea; la enfermedad del injerto contra el hospedante; una infección viral, tal como una infección por mV, una infección por VIH, SIDA, etc.; y una infección parasitaria, tal como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis, y otras, según pueden determinar los expertos en la técnica.

10 Un nivel de expresión de referencia puede ser, por ejemplo, el nivel de expresión de CA6 en tejido no enfermo del paciente (por ejemplo, procedente del mismo tipo de tejido que el que contiene el tumor), o el estándar de referencia puede determinarse, por ejemplo, a partir de un estándar aceptado en la técnica, tal como derivado de los niveles de expresión en tejidos no enfermos procedentes de una población de individuos.

15 Los términos “tratamiento” o “tratar”, tal como se emplean en la presente, se refieren al tratamiento terapéutico y a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen los que presentan el trastorno, así como los propensos a presentar el trastorno, o aquellos en los que el trastorno debe prevenirse.

Las expresiones “composición farmacéutica” o “composición terapéutica”, tal como se emplean en la presente, se refieren a un compuesto o una composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administran de modo adecuado a un paciente.

20 La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “vehículo fisiológicamente aceptable”, tal como se emplean en la presente, se refieren a uno o más materiales de formulación adecuados para realizar o potenciar el suministro de un anticuerpo o una proteína de unión similar a un anticuerpo modificada.

25 Los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz”, cuando se emplean haciendo referencia a una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos o proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas, se refieren a una cantidad o dosis suficiente para producir un resultado terapéutico deseado. De modo más específico, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de un anticuerpo o una proteína de unión similar a un anticuerpo modificada que es suficiente para inhibir, durante algún período de tiempo, uno o más de los procesos patológicos clínicamente definidos asociados con el trastorno que se está tratando. Tal como se emplea en la presente, una “cantidad terapéuticamente eficaz” también se refiere a una cantidad de proteína similar a un anticuerpo que es eficaz para visualizar un tejido que expresa CA6, por ejemplo, tejido tumoral. La cantidad eficaz puede variar dependiendo del anticuerpo o de la proteína de unión similar a un anticuerpo modificados específicos que se están utilizando, y también depende de una diversidad de factores y condiciones relacionadas con el paciente que se está tratando y con la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si el anticuerpo o la proteína de unión similar a un anticuerpo modificada se van a administrar *in vivo*, factores tales como la edad, el peso y la salud del paciente, así como las curvas de respuesta a la dosis y los datos de toxicidad obtenidos en estudios con animales preclínicos, estarán entre los factores a considerar. La determinación de una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica concreta está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

40 Los términos “adquiere” o “adquirir”, tal como se emplean en la presente, se refieren a obtener la posesión de una entidad física, o un valor, por ejemplo, un valor numérico, mediante la “adquisición directa” o la “adquisición indirecta” de la entidad física o el valor. La “adquisición directa” significa realizar un proceso (por ejemplo, realizar un método sintético o analítico) para obtener la entidad física o el valor. La “adquisición indirecta” se refiere a recibir la entidad física o el valor de otro grupo o fuente (por ejemplo, un tercer grupo de laboratorio que adquiere directamente la entidad física o el valor). La adquisición directa de una entidad física incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una sustancia física, por ejemplo, un material de partida. Los ejemplos de cambios incluyen fabricar una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cizallar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, y realizar una reacción química que incluye la ruptura o la formación de un enlace covalente o no covalente. La adquisición directa de un valor incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo, realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, por ejemplo, una muestra, un analito o un reactivo (a veces denominado en la presente un “análisis físico”).

45 La información que se adquiere indirectamente puede ser proporcionada en forma de informe, por ejemplo, suministrada en papel o en forma electrónica, tal como a partir de una base de datos en línea o aplicación (una “app”). El informe o la información pueden ser proporcionados, por ejemplo, por una institución sanitaria, tal como un hospital o una clínica; o un cuidador sanitario, tal como un médico o un enfermero.

55 Una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión similar a un anticuerpo modificada.

2. Usos de las proteínas de unión similares a anticuerpos

Las proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas de la invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de “sándwich” directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación para la detección y la cuantificación de uno o más antígenos objetivo. Las proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas se unirán a uno o más antígenos objetivo con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que se está empleando.

Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas realizaciones, las proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas pueden marcarse con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquier resto que sea capaz de producir, de modo directo o indirecto, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radiomarcador, un radioisótopo, un radionúclido, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{18}F , ^{11}C , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{124}I o ^{67}Ga ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o peroxidasa de rábano picante.

Un resto indicador apropiado puede ser detectado mediante una técnica de formación de imágenes concreta (por ejemplo, un indicador radiomarcado con $^{18}\text{F}/^{11}\text{C}/^{68}\text{Ga}/^{64}\text{Cu}/^{89}\text{Zr}/^{124}\text{I}$ para la formación de imágenes PET, un indicador marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{111}\text{In}$ para la formación de imágenes SPECT, un indicador marcado con un tinte fluorescente para la formación de imágenes ópticas, o un indicador marcado con un material paramagnético para MRI). Se recomienda una correspondencia apropiada entre la semivida biológica del anticuerpo o la proteína de unión similar a un anticuerpo y el período de semidesintegración físico del radiomarcador (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de radiomarcadores y su período de semidesintegración

Radiomarcador	Período de semidesintegración
^{68}Ga	68 min.
^{18}F	109 min.
^{64}Cu	12,7 h
^{89}Zr	78,4 h
^{124}I	100,2 h

El desarrollo de una proteína de unión similar a un anticuerpo o sonda para el diagnóstico acompañante de formación de imágenes fundamentalmente requiere un proceso similar al descubrimiento de fármacos (por ejemplo, comenzando a partir de una sonda objetivo, dosimetría de radiación, estudios de toxicidad realizados con prácticas de laboratorio correctas, producción con prácticas de fabricación correctas, evaluación preclínica, validación preclínica de la sonda objetivo y evaluación clínica). Otros parámetros que pueden evaluarse son: el momento óptimo para realizar la formación de las imágenes con relación a la administración del trazador, la correlación con análisis *ex vivo*, la biodistribución del trazador y la especificidad de objetivo (ensayos con un fragmento radiomarcado no pertinente). Tras haber sido totalmente desarrollada, la sonda de formación de imágenes moleculares puede emplearse como prueba de diagnóstico acompañante de formación de imágenes moleculares para un agente o fármaco concreto.

Las proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas de la invención también son útiles para la formación de imágenes *in vivo*. Una proteína de unión similar a un anticuerpo marcada con un resto detectable puede administrarse a un animal, preferiblemente a la corriente sanguínea, y ensayarse la presencia y la localización del anticuerpo marcado. La proteína de unión similar a un anticuerpo puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un animal, mediante resonancia magnética nuclear, tomografía de emisión de positrones, u otros medios de detección conocidos en la técnica.

La técnica de formación de imágenes *in vivo* puede utilizarse para formar la imagen de un tejido, tal como un tejido tumoral, para evaluar el nivel de expresión del glicotopo CA6 en el tejido. La determinación del nivel de expresión de CA6 en el tejido es útil, por ejemplo, para determinar si un paciente, tal como un paciente de cáncer, sería un buen candidato para el tratamiento con un fármaco dirigido a un glicotopo CA6. Por ejemplo, la proteína de unión similar a un anticuerpo es útil como prueba de diagnóstico acompañante para un agente citotóxico huDM6-DM4.

En una realización, un paciente se evalúa para un tratamiento con una molécula dirigida a CA6, tal como huDM6-DM4. El paciente se evalúa, por ejemplo, mediante la adquisición de información con respecto al nivel de expresión de CA6 en un tejido enfermo, tal como un tejido tumoral (por ejemplo, una biopsia de un tejido), y si se determina que el nivel de expresión de CA6 es mayor que 10% del nivel de expresión de referencia (por ejemplo, mayor o igual a 10%, 20%, 30%, 40% o más que un nivel de referencia), entonces se determina que el paciente es un buen candidato para un tratamiento con la molécula dirigida a CA6. Se predice que un paciente que es un buen candidato para un tratamiento con la molécula dirigida a CA6 responderá positivamente al tratamiento con la molécula. Se

determina que un paciente que no presenta un nivel adecuado de expresión de CA6, por ejemplo, menor que 10% de expresión de CA6, comparado con un estándar de referencia, no es un buen candidato para un tratamiento con una molécula dirigida a CA6.

5 Un nivel de expresión de referencia puede ser, por ejemplo, el nivel de expresión de CA6 en un tejido no enfermo del paciente (por ejemplo, del mismo tipo de tejido que el que contiene el tumor), o el estándar de referencia puede ser determinado, por ejemplo, a partir de un estándar aceptado en la técnica, tal como el derivado de los niveles de expresión en tejidos no enfermos procedentes de una población de individuos.

10 En una realización, el nivel de expresión de CA6 en un tejido de un sujeto se adquiere indirectamente, tal como a partir de un proveedor de servicios, una institución médica, un hospital o una clínica o la consulta de un médico, o a partir de un profesional sanitario, tal como un médico o un enfermero, o a partir de un agente de seguros, o a partir de una base de datos. En otra realización, el nivel de expresión de CA6 se determina directamente, tal como mediante la administración al sujeto de la proteína de unión similar a un anticuerpo incluida en la invención, y determinar el nivel de expresión de CA6 mediante una técnica de formación de bioimágenes.

15 A un paciente que se ha determinado que es un buen candidato para un tratamiento con una molécula dirigida a CA6 opcionalmente se le puede administrar después la molécula dirigida a CA6. En algunas realizaciones, un paciente tratado con una molécula dirigida a CA6 se controlará a intervalos (por ejemplo, cada semana, cada dos semanas, cada mes, cada dos meses) después de la administración de la molécula dirigida a CA6 para determinar si el nivel de expresión de CA6 está cambiando (por ejemplo, está disminuyendo) después del tratamiento con la molécula dirigida a CA6. Si después de una cierta cantidad de tiempo, o después de que el paciente presente
20 acontecimientos adversos, si el nivel de expresión de CA6 en el tejido enfermo sigue sin cambiar, puede tomarse la decisión de detener o de continuar el tratamiento con la molécula dirigida a CA6.

25 En una realización, un paciente se controla durante el tratamiento con una molécula dirigida a CA6, tal como huDM6-DM4. El paciente se controla, por ejemplo, adquiriendo información con respecto al nivel de expresión de CA6 en un tejido enfermo, tal como un tejido tumoral, después de la administración de una molécula dirigida a CA6 o un tratamiento con una molécula dirigida a CA6, tal como huDM6-DM4, y si se determina que el nivel de expresión de CA6 es mayor que 10% del nivel de expresión de referencia (por ejemplo, mayor o igual a 10%, 20%, 30%, 40% o mayor que un nivel de referencia), entonces se determina que el paciente es un buen candidato para un tratamiento continuado con la molécula dirigida a CA6. Si se determina que el nivel de expresión de CA6 ha disminuido durante el tratamiento con una molécula dirigida a CA6, tal como huDM6-DM4, entonces se determina
30 que el paciente ha respondido positivamente al tratamiento con la molécula, y que el tratamiento con huDS6-DM4 debe continuar. Se determina que un paciente que no presenta un nivel adecuado de expresión de CA6, por ejemplo, menor que 10% de expresión de CA6, comparado con un estándar de referencia, o que presenta un mayor nivel de expresión de CA6, no es un buen candidato para un tratamiento continuado con una molécula dirigida a CA6.

35 La invención, según se describe en la presente, también se refiere a un kit que comprende una proteína de unión similar a un anticuerpo y otros reactivos útiles para detectar niveles de antígenos objetivo en muestras biológicas. Estos reactivos pueden incluir un marcador detectable, suero de bloqueo, muestra de control positivo y negativo, y reactivos de detección.

4. Composiciones de proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas y su administración

40 Las composiciones que comprenden proteínas de unión similares a un anticuerpo modificadas están dentro del alcance de la invención. Estas composiciones de diagnóstico, terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de una proteína de unión similar a un anticuerpo, o un conjugado de fármaco-proteína de unión similar a un anticuerpo, mezclado con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable seleccionado por su idoneidad con respecto al modo de administración.

45 Los materiales de formulación aceptables preferiblemente no son tóxicos para los receptores en las dosis y las concentraciones empleadas.

50 La composición de diagnóstico o farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción, o la penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio, o bisulfito de sodio), amortiguadores (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, u otros ácidos orgánicos), agentes de relleno (tal como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA)), agentes formadores de complejo (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina, o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa, o
55 dextrinas), proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas), agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes, agentes emulgentes, polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de

- benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol, o polietilenglicol), alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol), agentes suspensores, tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic; PEG; ésteres de sorbitano; polisorbatos, tales como polisorbato 20 o polisorbato 80; Tritón; trometamina; lecitina; colesterol o Tyloxapol), agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metal alcalino, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, o manitol sorbitol), vehículos de transporte, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18ª Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), y ediciones posteriores del mismo).
- 5
- 10 La composición de diagnóstico o farmacéutica óptima será determinada por los expertos en la técnica dependiendo, por ejemplo, de la vía prevista de administración, el formato de administración y la dosificación deseada. Estas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de eliminación *in vivo* de la proteína de unión similar a un anticuerpo.
- 15 El principal vehículo o portador en una composición de diagnóstico o farmacéutica puede tener una naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado para la inyección puede ser el agua, una disolución salina fisiológica, o fluido cerebroespinal artificial, quizás suplementado con otros materiales habituales en composiciones para la administración parenteral. Otros ejemplos de vehículos son la disolución salina amortiguada neutra o la disolución salina mezclada con albúmina de suero. Otros ejemplos de composiciones farmacéuticas comprenden amortiguador de Tris con pH de aproximadamente 7,0-8,5, o amortiguador de acetato con pH de aproximadamente 4,0-5,5, que también pueden incluir sorbitol o un sustituto adecuado. En una realización de la invención, las composiciones de proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas pueden prepararse para la conservación mezclando la composición seleccionada con el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, las proteínas de unión similares a anticuerpos pueden formularse como un liofilizado empleando excipientes apropiados, tales como sacarosa.
- 20
- 25 Las composiciones de diagnóstico o farmacéuticas de la invención pueden seleccionarse para la administración parenteral. Como alternativa, las composiciones pueden seleccionarse para la inhalación o para la administración a través del tracto digestivo, tal como la administración oral. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro del conocimiento de la técnica.
- 30 Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de la administración. Por ejemplo, se emplean amortiguadores para mantener la composición al pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, generalmente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.
- 35 Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones de diagnóstico o terapéuticas para su uso en esta invención pueden estar en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable y apirógena, que comprende la proteína de unión similar a un anticuerpo deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es el agua destilada estéril, en la que se formula una proteína de unión similar a un anticuerpo en forma de una disolución isotónica estéril conservada de modo apropiado. Otra preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico)), perlas o liposomas, que proporcione la liberación controlada o sostenida del producto, que después puede administrarse mediante una inyección de liberación lenta. También puede emplearse el ácido hialurónico, y éste puede tener el efecto de estimular la duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen los dispositivos de administración de fármacos implantables.
- 40
- 45 En una realización, la composición de diagnóstico o farmacéutica puede formularse para la inhalación. Por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de unión similar a un anticuerpo modificada pueden formularse como un polvo seco para la inhalación. Las disoluciones de inhalación de proteínas de unión similares a un anticuerpo también pueden formularse con un propelente para la administración en aerosol. En otra realización, las disoluciones pueden nebulizarse.
- 50 También se contempla que ciertas formulaciones puedan administrarse por vía oral. En una realización de la invención, las proteínas de unión similares a un anticuerpo que se administran de este modo pueden formularse con o sin los vehículos que habitualmente se emplean para preparar formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para que libere la porción activa de la formulación en un punto del tracto gastrointestinal en el que la biodisponibilidad se maximice y la degradación presistémica se minimice. Pueden incluirse otros agentes para facilitar la absorción de la proteína de unión similar a un anticuerpo. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes suspensores, agentes disgregantes de comprimidos, y aglutinantes.
- 55 Otra composición de diagnóstico o farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de proteína de unión similar a un anticuerpo mezclada con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma

de dosis unitarias. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina, o goma arábiga; o agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

- 5 Otras composiciones de diagnóstico o farmacéuticas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica, e incluyen formulaciones que incluyen una proteína de unión similar a un anticuerpo en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una diversidad de otros medios de liberación sostenida o controlada, tales como vehículos de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación lenta. Otros ejemplos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.
- 10 Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas, copolímeros del ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl), etileno-acetato de vinilo, o poli(ácido D(-)-3-hidroxiburítico). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica.
- 15 Las composiciones de diagnóstico o farmacéuticas de la invención que se van a emplear para la administración *in vivo* generalmente deben ser estériles. Esto puede lograrse mediante una filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización, empleando este método, puede realizarse antes o después de la liofilización y la reconstitución. La composición para la administración parenteral puede conservarse en forma liofilizada o en una disolución. Además, las composiciones parenterales generalmente se
- 20 introducen en un recipiente que tiene un acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tenga un tapón que pueda ser atravesado por una aguja de inyección hipodérmica.

Tras haber formulado la composición de diagnóstico o farmacéutica, ésta puede conservarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones pueden conservarse en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiera una reconstitución antes de la administración.

25

La invención también incluye kits para producir una unidad de administración de dosis unitaria. Los kits pueden contener cada uno un primer recipiente que contiene una proteína seca y un segundo recipiente que contiene una formulación acuosa. Dentro del alcance de la invención también se incluyen kits que contienen jeringas prerrellenas de una única cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas para líquidos y liojeringas).

- 30 La composición también puede administrarse de modo local mediante la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. Cuando se emplea un dispositivo de implantación, éste puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación programada, o administración continua.

EJEMPLOS

- 35 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención y sus diversos usos. Solo se ofrecen con objetivos explicativos y no deben considerarse limitantes del alcance de la invención de ninguna forma.

Ejemplo 1: Radiomarcaje y caracterización *in vitro* del anticuerpo monoclonal DS6 humanizado y DS6-DM4

Un agente de formación de imágenes moleculares clínicamente útil produce imágenes de alto contraste dentro de una cantidad razonable de tiempo después de la administración, demuestra penetración en el tumor, tiene una cinética de eliminación más rápida y muestra una excelente proporción de tumor a sangre. Una salvedad en la utilización de anticuerpos nativos intactos para la formación de bioimágenes es la cinética inherentemente lenta de la captación tumoral y la eliminación de la sangre; también tienden a presentar un efecto de fondo alto y se requiere un tiempo muy largo (de horas a días) para obtener imágenes claras del tumor.

40

Previamente se ha demostrado que un trazador radiomarcado, combinado con la formación de bioimágenes, puede trasladarse desde un modelo tumoral preclínico hasta un entorno clínico (Williams et al., 2008, Cancer Biother and Radiopharm 23(6):797; Liu et al., (2009) Mol Imaging Biol 12:530). Los inventores también han demostrado que un anticuerpo DS6 radiomarcado y DS6-DM4 se han dirigido con eficacia a tumores de xenoinjerto WISH en ratones. Basándose en estos resultados, se desarrollaron tres proteínas de unión similares a un anticuerpo modificadas para una farmacocinética optimizada como pruebas de diagnóstico acompañante basado en la formación de imágenes.

45

50 Ejemplo 2: Expresión de B-Fab de DS6 modificado

Se propagaron plásmidos de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera de las correspondientes construcciones en células de *E. coli* DH5 α . Los plásmidos empleados para la transfección se prepararon a partir de *E. coli* utilizando el kit Qiagen EndoFree Plasmid Mega Kit (las secuencias de ADN y de los polipéptidos para la proteína de unión similar a un anticuerpo B-Fab aparecen en la Tabla 2).

5 La proteína de unión similar al anticuerpo DS6 B-Fab se produjo mediante la transfección transitoria de células HEK293 en medio FreeStyle F17 (Invitrogen). Siete días después de la transfección se recolectó el sobrenadante y se sometió a centrifugación y una filtración de 0,2 µm para eliminar las partículas. La purificación se realizó mediante una captura sobre KappaSelect (GE Healthcare). Después de la unión en la columna KappaSelect, la columna se lavó con PBS o amortiguador HEPES (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2, FP12016), seguido de una elución con glicina 0,1 M (pH 2,5) y una neutralización con Tris 1 M/HCl, pH 9. La etapa de refinamiento de la purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular empleando Superdex 200 (GE Healthcare) con PBS o amortiguador HEPES (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2, FP12016). Después de la etapa de refinamiento, el producto de la purificación se concentró mediante ultrafiltración, y por último el DS6 B-Fab se esterilizó mediante filtración empleando una membrana de 0,22 µm.

10 La concentración de proteínas se determinó mediante la medida de la absorbancia a 280 nm. Cada lote se analizó mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras para determinar la pureza y el peso molecular de cada subunidad y del monómero. La calidad del DS6 B-Fab purificado se comprobó mediante los métodos analíticos descritos a continuación.

15 Tabla 2. Secuencias de ADN y de los polipéptidos para B-Fab basado en DS6

Secuencia de aminoácidos para: V _{L1} -L ₁ -V _{L2} -C _L (SEQ ID NO: 1)	EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLIY STSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQRSSFPLT FGAGTKLELK GGGSGGGGSE EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSS VSFMHWFQQKPGTSPKLIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTIS MEAEADAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELK RTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Secuencia de aminoácidos para: V _{L1} anti-CA6 (SEQ ID NO: 2)	EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLIY STSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQRSSFPLT FGAGTKLELK
Secuencia de aminoácidos para: Enlazador L ₁ (SEQ ID NO: 3)	GGGSGGGGGS
Secuencia de aminoácidos para: V _{L2} anti-CA6 (SEQ ID NO: 2)	EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLIY STSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQRSSFPLT FGAGTKLELK
Secuencia de aminoácidos para: C _L de IGKC humana (SEQ ID NO: 4)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
Secuencia codificante de ADN para: V _{L1} -L ₁ -V _{L2} -C _L (SEQ ID NO: 5)	gaaatcgtgctgaccagagccccgccaccatgtctgccagccctggc gagagagtcaccatcacctgtagcgcaccacagcagcgtcagtttcatg cactgggtccagcagaagcccggcaccagcccaagctgtggatctac agcaccagcagcctcggcagcggcgtcccagctcgctttggcggcagc ggctctggcaccagctacagcctgaccatcagcagcatggaagccgag gacgcccaccactactactgcccagcagcggagcagcttcccctgacc ttcgccgctggcaccagctggaactgaagggcggagggcgatccggc ggcggaggctccgagattgtgctgacacagctctccagccaccatgagc gcctccccagggcagcgcgtgacaatcacatgctccgcccactcctcc gtgtctttatgcattggtttcagcagaaaactgggacatcccctaaa ctctggatctactccacctcctccctggcctccggggtgcccgctaga tttgaggctctggcagcggcaccctcctactccctgaccatctcctct atggaagctgaagatgctgcaacatattatggcagcagagaagctcc tcccactgacatttggggccggaacaaagctcgagctgaagcgtacg gtggccgctcctccggttcatcttccctccctccgacgagcagctg aagtcggcaccgctccgtggtgtgtctgctgaacaacttctacct cgggaggccaaggtgagtggaaggtggacaacgccctgagtcggc aactcccaggagtcgctcaccgagcaggactccaaggacagcacctac tccctgtcctccaccctgaccctgtccaagggccgactacgagaagcac aaggtgtacgctgtgaggtgaccaccagggcctgtccagccctgtg accaagtccttcaaccggggcagtg

<p>Secuencia codificante de ADN para: V_{L1}-L₁-V_{L2}-C_L (SEQ ID NO: 6)</p> <p>Con secuencia señal</p>	<p>atgggctggtcctgcatcatcctgtttctggtggccacagccaccggc gtgcacagcgaatcgtgctgaccagagccccgccaccatgtctgcc agcctggcgagagagtcaccatcacctgtagcggccacagcagcgtc agtttcatgcaactggttccagcagaagccggcaccagccaaagctg tggatctacagcaccagcagcctcgccagcggcgtcccagctcgcttt ggcggcagcggctctggcaccagctacagcctgaccatcagcagcatg gaagccgagagcggccaccctactactgccagcagcggagcagctt ccctgaccttcggcgctggcaccagctggaactgaagggcggaggc ggatccggcggcggaggctccgagattgtgctgacacagctctccagcc accatgagcgcctccccaggcggagcgcgtgacaatcacatgctccgcc cactcctccgtgctttatgcatgggttcagcagaaacctgggaca tccctaaactctggatctactccacctcctccctggcctccggggtg cccgtagatttggaggctctggcagcggcacctcctactcctgacc atctcctctatggaagctgaagatgctgcaacatattattgccagcag agaagctcctcccactgacatttggggccggaacaaagctcgagctg aagcgtacggtggcggctcctccgtgttcatctcctccctccgac gagcagctgaagtccggcaccgctcctgggtgtgctgctgaacaac ttctaccctcgggaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctg cagtcgggaactcccaggagtcgctcaccgagcaggactccaaggac agcacctactcctgtcctccacctgacctgtccaagggcggactac gagaagcacaaggtgtacgcctgtgaggtgaccaccaggcctgtcc agcctgtgaccaagctccttcaaccggggcggagtgc</p>
<p>Secuencia de aminoácidos para:</p>	<p>EAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWI</p>
<p>V_{H1}-L₂-V_{H2}-C_{H1} (SEQ ID NO: 7)</p>	<p>GYIYPGNATNYNQKFQ GKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFC ARGDSVPFAYWGQGLVTVSA GGGGSGGGGSEAQLVQSGAEVVKPGAS VKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNATNYNQKFQ GKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDSVPFAYWGQGLV TVSAASTKGPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDRKVEPKSCDKTHT</p>
<p>Secuencia de aminoácidos para: V_{H1} anti-CA6 (SEQ ID NO: 8)</p>	<p>EAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWI GYIYPGNATNYNQKFQ GKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFC ARGDSVPFAYWGQGLVTVSA</p>
<p>Secuencia de aminoácidos para: Enlazador L₂ (SEQ ID NO: 3)</p>	<p>GGGGSGGGGS</p>
<p>Secuencia de aminoácidos para: V_{H2} anti-CA6 (SEQ ID NO: 8)</p>	<p>EAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWI GYIYPGNATNYNQKFQ GKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFC ARGDSVPFAYWGQGLVTVSA</p>
<p>Secuencia de aminoácidos para: Domino constante de cadena pesada humano C_{H1} (SEQ ID NO: 9)</p>	<p>ASTKGPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT</p>
<p>Secuencia codificante de ADN para V_{H1}-L₂-V_{H2}-C_{H1} (SEQ ID NO: 10)</p>	<p>gaggccagctggtgcaactcctgctggtggtcaagcctggggcc agcgtgaagatgagctgcaaggccagcggctacacctcaccagctac aacatgcaactgggtcaagcagaccagggcaggcctggaatggatt ggctacatctacccggcaacggcggccaccaactacaaccagaagttc cagggcaaggtacctgaccggcggacctagcagcagcaccgctac atgagatcagcagcctgaccagcaggacagcggcgtacttctgc gccagaggcagcagcgtgacctcgcctattggggccagggcaccctg gtcacagtgtctgctggtggcggaggatccggcggaggcggaaagcga gcccagctcgtccagagcggagccgaggtcgtgaaaccagcggcctct gtgaagatgcttgcaaggcctctggctataccttacctctataat atgcatgggtcaaacagacacctggacagggactcgagtgatcgga tatatctatcctggaatggggccacaattacaatcagaaatctcag gggaaagccacactgacagccgatcccagctcctccacagcctatag cagattagctctctgacctccgaggactccgctgtattttgtgccc cggggagactccgtgacctttgcttactggggacagggcacactcgtg acagtgctccgcccgttccaccaagggccctcctgtttcctctggcc cccagcagcaagagcactctggcggaaacagccgctgggctgacctg gtcaaggactacttcccagcggcggcagcgtgcttggaaactctggc gcctgacctccggcgtccacaccttccagcctgctgagagcagc ggcctgactctctgagcagcgtcgtgacctgcccagcagcagcctg gggaccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacacc aaqgtqqaacaqaqgtqqaacccaqaqctqcaacaqaacccacacc</p>

<p>Secuencia codificante de ADN para V_{H1}-L₂-V_{H2}-C_{H1} (SEQ ID NO: 11)</p> <p>Con secuencia señal</p>	<p>atgggctggctcctgcatcctcctgcttctggggtggccacagccaccggc gtgcactctgaggcccagctggtgcagctctggcctgaggtggtcaag cctggggccagcgtgaagatgagctgcaaggccagcggtacacctc accagctacaacatgcactgggtcaagcagaccccagggcagggcctg gaatggattggctacatctacccggcaacggcgccaccaactacaac cagaagtccagggcaaggctaccctgaccgcccaccctagcagcagc accgctacatgcagatcagcagcctgaccagcagggacagcgccgtg tacttctgcccagagggcagcagcgtgcctctcgctattggggccag ggcaccctggtcacagtgtctgctggggcggaggatccggcggaggc ggaagcgaagcccagctcgtccagagcggagccgaggtcgtgaaacca ggcgctctgtgaagatgtctgcaaggcctctggctataccttacc tcctataaatatgcatgggtcaaacagacacctggacagggactcgag tggatcggatatactatcctggaaatggggccacaaattacaatcag</p>
	<p>aaatttcaggggaaagccactgacagccgatcccagctcctccaca gcctatagcagattagctctctgacctccgaggactccgccgtgat ttttgtgcccgggagactccgtgcttttgcctactggggacagggc aacctcgtgacagtgtccgcccctccaccaaggcccctccgtggtt cctctggccccagcagcaagagcacctctggcggaacagccgctg ggctgctggtcaaggactacttccccgagcccgtgacctgtcttg aactctggcgccctgacctccggcgtccacaccttccagccgtgctg cagagcagcggcctgtactctctgagcagcgtcgtgacctgcccagc agcagcctggggaccagacctacatctgcaacctgaaccacaagccc agcaacaccaaggtggacaagaaggtggaacccaagagctcgacaag accacacc</p>

Ejemplo 3: Desarrollo de proteínas de unión similares a un anticuerpo modificadas basadas en el anticuerpo DS6

5 Para desarrollar una proteína de unión similar a un anticuerpo para el diagnóstico acompañante basado en la formación de imágenes para huDS6-DM4, se crearon tres proteínas de unión similares a anticuerpos modificadas (B-Fab, véase la Figura 1) basadas en las secuencias de unión de CA6 procedentes del anticuerpo monoclonal DS6 humanizado. Cada una de las tres proteínas de unión similares a un anticuerpo modificadas se purificó y se ensayó como se describe a continuación; los resultados aparecen en la Tabla 3. Las características deseables incluyen >95% de pureza mediante HPLC o SDS-PAGE, una concentración de ~10 mg/ml, un péptido estable, una unión similar al anticuerpo DS6, y la determinación de que la presencia de una etiqueta de polihistidina (6x-His) pueda afectar a los trazadores de PET. Otros criterios de selección incluyen: una señal tumoral de >5% ID/g; una proporción de tumor a músculo de 3:1; una eliminación renal eficaz; y una diferencia estadísticamente significativa (p < 0,05) entre la captación no bloqueada y bloqueada (véase la Tabla 4 para un resumen de los criterios de calidad para B-Fab quelado radiomarcado).

15

Tabla 3. Resumen de las proteínas de unión similares a un anticuerpo modificadas de DS6

Formato	Descripción	Pureza (SEC)	ID (MS)	Estabilidad (Tfusión)	K _d (nM)
B-Fab 1151	Enlazador (G4S) ₂ con etiqueta 6xHis C-terminal	>95%	OK	58°C	3,4
B-Fab 1152	Enlazador G4S con etiqueta 6xHis C-terminal	>95%	OK	59°C	88
B-Fab 1153	Enlazador (G4S) ₂ sin etiqueta 6xHis C-terminal	>95%	OK	57°C	2,3
mAb DS6	Anticuerpo monoclonal DS6				2,0

Tabla 4. Resumen de los criterios de calidad para la proteína de unión similar a un anticuerpo quelada radiomarcada

Especificaciones del ensayo de diagnóstico acompañante de formación de imágenes	Criterios de aceptación/limite
Pureza (HPLC)	>95-98% monomérica
Ensayo de unión a células <i>in vitro</i>	>90% para estirpes celulares CA6+ <5% para estirpes celulares CA6- - nM baja
Estabilidad	>80% después de 24 horas a 37°C en suero
Parámetros de la formación de imágenes	%IC del tumor/g \geq 5 Proporción de tejido tumoral a tejido normal 3:1 Actividad específica (Ci/ μ mol) 2-5

Se determinó que el anticuerpo B-Fab contenía un enlazador (G4S)₂, y que, con o sin una etiqueta 6x-His, mantenía unas eficacias de unión similares a las del anticuerpo monoclonal DS6 de control a partir del que se basan las secuencias de unión de CA6. La calidad de cada una de las proteínas de unión similares a un anticuerpo purificadas se comprobó mediante los siguientes métodos analíticos:

a) Cromatografía de exclusión molecular analítica (SEC)

Se realizó una SEC analítica empleando un ÄKTA explorer 10 (GE Healthcare) equipado con una columna TSKgel G3000SWXL (7,8 mm x 30 cm) y una columna de guarda TSKgel SWXL (Tosoh Bioscience). El análisis se realizó a 1 ml/min. empleando NaCl 250 mM, fosfato de Na 100 mM, pH 6,7, con detección a 280 nm. Se aplicaron 30 microlitros de muestra de proteína (a 0,5-1 mg/ml) a la columna. Para calcular el tamaño molecular, la columna se calibró empleando una mezcla de patrones de filtración en gel (MWGF-1000, SIGMA Aldrich). La evaluación de los datos se realizó empleando el programa informático UNICORN v5.11.

b) Análisis de masa intacta mediante LC-MS

Cada muestra se diluyó hasta una concentración de 0,01 mg/ml y después se redujo añadiendo DTT (concentración final 10 mM). Antes de la separación, la muestra se atrapó durante 20 minutos y después se desaló con 20 μ l/min. en una columna de atrapamiento monolítica con acetonitrilo al 2%/TFA al 0,1% (en v/v) antes de la elución con un gradiente que varía desde eluyente A (H₂O/TFA al 0,05%) al 15% hasta eluyente B (acetonitrilo/TFA al 0,05%) al 50%.

Cada muestra se separó empleando un nanoflujo (300 nl/min.) en una columna monolítica (PSDVB; D.I. 100 μ m x 5 cm) a 37°C. La introducción de cada muestra se realizó empleando agujas de electronebulización de un nuevo objetivo con un diámetro externo de 365 μ m, un diámetro interno de 75 μ m y un diámetro de la punta de 15 μ m más el gas de la envuelta. Después de la adquisición en un QStar XL, los espectros se sumaron a lo largo del correspondiente intervalo de tiempo y se deconvolucionaron empleando la herramienta de reconstrucción de proteínas incluida en BioAnalyst de Applied Biosystems/MDS Sciex.

c) Identificación de proteínas mediante análisis de la huella de masa peptídica empleando LC-MS

La línea de interés se extrajo, se carbamidometiló y se digirió con la endoproteinasa tripsina. Después la muestra se analizó mediante LC-MS/MS empleando un espectrómetro de masas OrbiTrap XL. Los espectros obtenidos se compararon con la base de datos definida por los usuarios Swiss-Prot PP a la cual se añadió el constructo concreto, así como con todas las especies de la base de datos Swiss-Prot.

Cada una de las tres proteínas de unión similares a un anticuerpo basadas en DS6 modificadas se conjugó químicamente con el quelante de cationes de ácidos duros DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético), se radiomarcó con ⁶⁴Cu, y se empleó para experimentos de formación de bioimágenes PET *in vivo* en modelos tumorales preclínicos y en ensayos de unión celulares *in vitro* para caracterizar cada una de las tres proteínas de unión similares a un anticuerpo basadas en DS6 modificadas. En la Tabla 5 y en las Figuras 2-4 puede observarse un resumen de los datos de estas actividades y experimentos para cada anticuerpo modificado.

Tabla 5. Resumen de las actividades de las proteínas de unión similares a un anticuerpo modificadas de DS6

	B-Fabs
Pureza (SEC)	>95%
Estabilidad <i>in vitro</i> :	
Estrés de congelación/descongelación (3x -80°C/RT)	Bien tolerado
Estrés térmico (1 semana a 42°C)	Bien tolerado
Estabilidad sérica (24 horas a 37°C)	>90% monomérica
Afinidades de unión FACS (estirpe celular WISH, CA6+)	2 nM
Rendimiento radioquímico	60-80%
Parámetros de formación de imágenes	
Tumor (WISH, CA6+)	7,5-10,4% ID/g
Tumor (A2780, CA6-)	4-5,6% ID/g
Biodistribución	
Hígado	7-10% ID/g
Riñón	57-73% ID/g
Sangre	2-3% ID/g
Músculo	~1% ID/g
Proporción de tejido tumoral WISH a tejido normal:	
Tumor/sangre	4-6
Tumor/músculo	9-11
Proporción de tumor WISH (CA6+) a tumor A2780 (CA6-)	1,7-1,9
WISH es una estirpe celular positiva para el antígeno CA6. A2780 es una estirpe celular negativa para el antígeno CA6.	

5 Todas las anteriores proteínas de unión similares a anticuerpos y sus correspondientes conjugados con DOTA (1,5-2,5 DOTA/fragmento) presentan una alta afinidad ($K_d = 4-20$ nM) por las células CA6-positivas (estirpe celular WISH), lo cual indica que la derivación con DOTA no afecta de modo adverso a la afinidad por el antígeno. Los fragmentos presentan una baja afinidad por las células CA6-negativas (estirpe celular A2780). Los agentes marcados con ^{64}Cu se evaluaron mediante estudios de estabilidad en suero humano y formación de imágenes *in vivo* y estudios de biodistribución a las 24 horas en ratones atímicos que portan tumores subcutáneos WISH o A2780. El ^{64}Cu -DOTA-B-Fab se sintetizó con un alto rendimiento (RCY - 80%, SA - 55 GBq/ μmoles , >99% de pureza) y produjo unos buenos resultados en los ensayos de estabilidad en suero a las 24 horas ($94 \pm 5\%$, $n = 3$).
10 Los experimentos de biodistribución *in vivo* (véase la Tabla 6) en ratones que portan tumores de xenoinjertos mostraron una captación relativamente alta en el tumor WISH ($7,6 \pm 0,87\%$ ID/g, $n = 4$, 20-206 mg) y una captación baja en el tumor A2780 ($5,1 \pm 0,92\%$ ID/g, $n = 3$, 50-270 mg), combinado con unas altas proporciones de tumor/músculo (8,7:1), tumor/sangre (3,6:1) y tumor positivo/negativo (1,8, $p < 0,05$, $n = 7$). La captación por el tumor
15 solo fue sobrepasada por los riñones ($62 \pm 4\%$ ID/g) y el hígado ($10 \pm 0,75\%$ ID/g).

Tabla 6. Resumen de los estudios de biodistribución en ratones que portan tumores de xenoinjertos

	Tumor WISH (%ID/g)	Tumor A2780 (%ID/g)	Proporción WISH/A2780	Hígado (%ID/g)	Riñones (%ID/g)
⁶⁴ Cu-DOTA-B-Fab	7,6±0,87	5,1±0,92	1,5	10±0,75	62±4
⁶⁴ Cu-DOTA-anti lisozima-B-Fab	4,84±1,02	3,84±0,49	1,26	15,2±1,3	70±9,6
⁶⁴ Cu-DOTA-anti-DM4-B-Fab	4,04±0,43	3,03±0,24	1,33	10,4±1,6	52±8,3

El ⁶⁴Cu-DOTA-B-Fab también se evaluó en animales que portan tumores WISH para la especificidad mediante estudios de bloqueo *in vivo*. El bloqueo se realizó mediante la administración de B-Fab (2 mg, n = 5) o DS6 (1 mg, n = 4) a las 2,5 o 25 horas, respectivamente, antes de la administración del agente radiomarcado. El bloqueo de B-Fab produjo una disminución del 23% (p <0,05, n = 8) en la captación del tumor WISH, mientras que el bloqueo de DS6 logró una disminución del 26% (p <0,05, n = 7). Los tumores de control (n = 3) no fueron bloqueados en este estudio. Estos estudios preclínicos sugieren que ⁶⁴Cu-DOTA-B-Fab es un compuesto para el diagnóstico acompañante adecuado para huDS6-DM4 en pacientes.

10 Ejemplo 4: Estudios de PET *in vivo* de anticuerpos modificados desarrollados en modelos tumorales preclínicos

a) B-Fab con enlazador (G4S)₂ y etiqueta 6x-His C-terminal

15 El B-Fab 1151 es una proteína de unión similar a un anticuerpo modificada basada en DS6 que contiene ambos enlazadores L1 y L2 que son GGGGSGGGGS ((G4S)₂) (SEQ ID NO: 3) y que contiene una etiqueta 6x-His C-terminal expresada. La proteína se purificó mediante IMAC y SEC y se preparó una disolución de unión *in vitro* a 1,8 mg/ml en PBS y se caracterizó la afinidad de unión empleando una citometría de flujo en la estirpe celular WISH CA6+ (Figura 2C y Figura 2D).

b) B-Fab con enlazador (G4S)₂

20 El B-Fab 1153 es una proteína de unión similar a un anticuerpo modificada basada en DS6 que contiene ambos enlazadores L1 y L2 que son (G4S)₂ y que no contiene una etiqueta 6x-His C-terminal. Puesto que esta proteína carece de etiqueta His, la proteína fue purificada mediante IMAC, Kappa-select y SEC. La disolución de unión *in vitro* se preparó a 1,6 mg/ml en PBS y se caracterizó la afinidad de unión empleando una citometría de flujo en la estirpe celular WISH CA6+ (Figura 3C y Figura 3D).

c) B-Fab con enlazador G4S y marcador 6x-His C-terminal

25 El B-Fab 1152 es una proteína de unión similar a un anticuerpo modificada basada en DS6 que contiene ambos enlazadores L1 y L2 que son una única copia de G4S y que contiene una etiqueta 6x-His C-terminal. La proteína se purificó mediante IMAC y SEC, se preparó la disolución de unión *in vitro* a 1,8 mg/ml en PBS, y se caracterizó la afinidad de unión empleando una citometría de flujo en la estirpe celular WISH CA6+ (Figura 4C y Figura 4D).

Ejemplo 5: Resultados de unión *in vitro* para DS6 con y sin DOTA

30 Para demostrar que la conjugación con DOTA no altera la actividad de DS6, se ensayó la unión de la proteína de unión similar al anticuerpo DS6 y el anticuerpo conjugado DOTA-DS6 *in vitro* en la estirpe celular WISH CA6-positiva y la estirpe celular A2780 CA6-negativa. Unos experimentos de clasificación de células activada por fluorescencia determinaron que la conjugación con DOTA no altera la unión de DS6 en las células WISH CA6-positivas (véase la Figura 5).

35 Ejemplo 6: Radiomarcado y estabilidad de la proteína de unión similar a un anticuerpo ⁶⁴Cu-DOTA-DS6 B-Fab

40 Se realizaron estudios de estabilidad en suero humano y estudios de biodistribución a las 24 horas empleando DS6 B-Fab conjugado con DOTA marcado con cobre-64 en ratones atómicos que portan tumores subcutáneos CA6-positivos (WISH) o CA6-negativos (A2780). Los estudios de radioquímica demostraron que la proteína de unión similar a un anticuerpo modificada ⁶⁴Cu-DOTA-DS6 B-Fab tiene un rendimiento radioquímico de aproximadamente 30%, una pureza radioquímica de >95%, y una actividad específica de 1,9 Ci/μmol (véase la Figura 6A). Los experimentos de estabilidad en suero de la proteína de unión similar a un anticuerpo ⁶⁴Cu-DOTA-DS6 B-Fab se realizaron durante 24 horas en suero humano a 37°C, y mostraron una actividad del 97,2% en el momento de la hora 0, y una actividad del 96,3% en el momento de las 24 horas, lo cual demuestra que no se produce una pérdida significativa en la actividad después de 24 horas (véase la Figura 6B).

Ejemplo 7: Comparación entre proteínas de unión similares a anticuerpos con diferentes andamiajes

Las propiedades de la proteína de unión similar a un anticuerpo B-Fab descrita anteriormente se compararon con las de un diacuerpo que se une específicamente a CA6, para evaluar cuál es el andamiaje más adecuado para su uso como prueba de diagnóstico acompañante de formación de imágenes. La secuencia de aminoácidos de este diacuerpo anti-CA6, que forma un homodímero, se muestra en SEQ ID NO:12 (Tabla 7). En algunos experimentos, este diacuerpo homodimérico comprende también una etiqueta C-terminal seleccionada del grupo que consiste en una etiqueta GGC, una etiqueta de SEQ ID NO:13, y una etiqueta de SEQ ID NO:14.

Tal como se muestra en la Figura 7, el diacuerpo tiene un andamiaje que es diferente del andamiaje de la proteína de unión similar a un anticuerpo B-Fab. Por ejemplo, no comprende ningún dominio C_L ni C_{H1}.

Tabla 7. Secuencia polipeptídica del diacuerpo que se une específicamente a CA6

Secuencia de aminoácidos par el diacuerpo (SEQ ID NO: 12)	<u>EIVLTQSPATMSASPGERVTTITCSAHSSVSFMHWFQOKPGTSPKLIY</u> <u>STSSLASGVPARFGGSGSGTISYSLTISSMEAEDAATYYCQRSSFPLT</u> <u>FGAGTKLELKGSGGGGGAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT</u> <u>SYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFGKATLTADPSSST</u> <u>AYMQISSLTSEDSAVYFCARGDSVFPAYWGQGLTLVTVSA</u>
Etiqueta C-terminal (SEQ ID NO: 13)	GGHHHHHH
Etiqueta C-terminal (SEQ ID NO: 14)	GGCGGHHHHHH

Los resultados se muestran en las siguientes tablas 8A a 8C. Estos resultados se obtuvieron comparando un diacuerpo de SEQ ID NO:12 fusionado a una etiqueta de SEQ ID NO:14, con el B-Fab 1153 (que contiene un enlazador (G4S)₂ pero sin la etiqueta His).

Tabla 8A. Comparación entre el B-Fab y el diacuerpo

Andamiaje	Agregación (SEC)	Estabilidad <i>in vitro</i> : estrés de congelación/descongelación (3X - 80°C-->RT)	Estabilidad <i>in vitro</i> : estrés térmico (1 semana a 42°C)	Ensayo de unión FACS (libre) Kd app (nM)	Ensayo de unión FACS (conjugado con DOTA) Kd app (nM)
B-Fab	>95% monomérica	Bien tolerado	Bien tolerado	4	7.4
Diacuerpo	>95% monomérica	Bien tolerado	Pérdida significativa (~25%) de proteína soluble	10	7.5

Tabla 8B. Comparación entre el B-Fab y el diacuerpo

Andamiaje	Rendimiento radioquímico	Pureza radioquímica	Actividad específica (Ci/μmol)	Estabilidad sérica de andamiajes radiomarcados: 24 h a 37°C
B-Fab	40 - 80%	>99%	1,5	>90% monomérica
Diacuerpo	10 - 15%	>99%	0,3	~40% monomérica

Tabla 8C. Comparación entre el B-Fab y el diacuerpo

Andamiaje	Señal tumoral en modelo de tumor positivo a antígeno (WISH) (%ID/g) 24 h P.I.	Señal tumoral en modelo de tumor negativo a antígeno (A2780) (%ID/g) 24 h P.I.	Proporción de tumor a músculo en modelo de tumor positivo a antígeno (WISH) 24 h P.I.	Proporción de tumor a sangre en modelo de tumor positivo a antígeno (A2780) 24 h P.I.	Ruta principal de eliminación	Perfil de biodistribución 24 h después de la inyección (P.I.)
B-Fab	7,5 – 10,4 [tres experimentos independientes]	4 – 5,6 [tres experimentos independientes]	9 - 11 [tres experimentos independientes]	4 - 6 [tres experimentos independientes]	Renal	Sí riñón: 57-73%ID/g Hígado: 7-10% ID/g
Diacuerpo	4,3	3,2	~4	~2	Renal	Sí riñón: 104% ID/g Hígado: 10%IDg

5 A partir de estos resultados puede concluirse que B-Fab es mejor que el diacuerpo para su uso como compuesto para el diagnóstico acompañante. Por ejemplo, el diacuerpo presenta degradación en el ensayo de estabilidad plasmática y en el ensayo de estrés térmico, mientras que B-Fab es estable en ambos ensayos.

Aunque la invención se ha descrito en términos de diversas realizaciones, se entiende que a los expertos en la técnica se les ocurrirán variaciones y modificaciones. Además, los encabezados de las secciones empleados en la presente solo tienen un carácter organizativo y no deben considerarse limitantes de la materia descrita.

10 Cada realización descrita en la presente puede combinarse con cualquier otra realización o realizaciones a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica o realización indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características o realización o realizaciones indicadas como preferidas o ventajosas, a menos que se indique claramente lo contrario.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> SANOFI
- 15 Kruip, Jochen
- Sarkar, Susanta K.
- Gebauer, Mathias
- Lange, Christian
- Focken, Ingo
- 20 <120> AGENTE DE FORMACIÓN DE INMUNOIMÁGENES PARA USO CON LA TERAPIA DE CONJUGADO DE ANTICUERPO-FÁRMACO
- <130> 12-1363-WO2
- <150> US 61/761,190
- < 151> 2013-02-05
- 25 <150> EP 14305082.1
- < 151> 2014-01-21
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

ES 2 657 053 T3

< 211> 329

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

5 < 223> Péptido sintético

<400> 1

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

ES 2 657 053 T3

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser
 115 120 125

Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser
 130 135 140

Val Ser Phe Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys
 145 150 155 160

Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg
 165 170 175

Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
 180 185 190

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser
 195 200 205

Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
 210 215 220

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 225 230 235 240

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 245 250 255

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 260 265 270

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 275 280 285

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 290 295 300

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 325

<210> 2

< 211> 106

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido sintético

<400> 2

ES 2 657 053 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 3

< 211> 10

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido sintético

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

10 <210> 4

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

ES 2 657 053 T3

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 5

< 211> 987

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 5

gaaatcgtgc tgaccagag ccccgccacc atgtctgcc ggcctggcga gagagtcacc 60
 atcacctgta ggcgccacag cagcgtcagt ttcattgact gggtccagca gaagcccggc 120
 accagcccaa agctgtggat ctacagcacc agcagcctcg ccagcggcgt cccagctcgc 180
 tttggcggca gcggtcttgg caccagctac agcctgacca tcagcagcat ggaagccgag 240
 gacgcccga cctactactg ccagcagcgg agcagctttc ccctgacctt cggcgctggc 300
 accaagctgg aactgaaggg cggaggcggg tccggcggcg gaggtccga gattgtgctg 360
 acacagtctc cagccacat gagcgcctcc ccaggcgagc gcgtgacaat cacatgctcc 420
 gccactcct cgtgtcttt tatgcattgg tttcagcaga aacctgggac atcccctaaa 480
 ctctggatct actccacctc ctccctggcc tccggggtgc ccgctagatt tggaggctct 540
 ggcagcggca cctcctactc cctgaccatc tcctctatgg aagctgaaga tgctgcaaca 600
 tattattgcc agcagagaag ctccctccca ctgacatttg gggccggaac aaagctcgag 660
 ctgaagcgtg cgtggccgc tccttccgtg ttcattctcc ctccctccga cgagcagctg 720
 aagtccggca ccgcctccgt ggtgtgtctg ctgaacaact tctaccctcg ggaggccaag 780
 gtgcagtggg agtgggacaa cgcctgcag tccggcaact cccaggagtc cgtcaccgag 840
 caggactcca aggacagcac ctactccctg tcctccacc tgaccctgtc caaggccgac 900
 tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag gtgaccacc agggcctgtc cagccctgtg 960
 accaagtctc tcaaccgggg cgagtgc 987

10 <210> 6

< 211> 1044

< 212> ADN

ES 2 657 053 T3

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 6

```

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccacag ccaccggcgt gcacagcgaa      60
atcgtgctga cccagagccc cgccaccatg tctgccagcc ctggcgagag agtcaccatc      120
acctgtagcg cccacagcag cgtcagtttc atgcaactgg tccagcagaa gcccggcacc      180
agcccaaagc tgtggatcta cagcaccagc agcctcgcca gggcgctccc agctcgcttt      240
ggcggcagcg gctctggcac cagctacagc ctgaccatca gcagcatgga agccgaggac      300
gccgccacct actactgccg gcagcggagc agctttcccc tgaccttcgg cgctggcacc      360
aagctggaac tgaagggcgg aggcggatcc ggcggcggag gctccgagat tgtgctgaca      420
cagtctccag ccaccatgag cgcctcccca ggcgagcgcg tgacaatcac atgctccgcc      480
cactcctccg tgtcttttat gcattggttt cagcagaaac ctgggacatc ccctaaactc      540
tggatctact ccacctcctc cctggcctcc ggggtgcccg ctagatttgg aggctctggc      600
agcggcacct cctactccct gaccatctcc tctatggaag ctgaagatgc tgcaacatat      660
tattgccagc agagaagctc cttcccactg acatttgggg ccggaacaaa gctcgagctg      720
aagcgtacgg tggccgctcc ttccgtgttc atcttccctc cctccgacga gcagctgaag      780
tccggcaccg cctccgtggt gtgtctgctg aacaacttct accctcggga ggccaaggtg      840
cagtggaagg tggacaacgc cctgcagtcc ggcaactccc aggagtccgt caccgagcag      900
gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc tccaccctga ccctgtccaa ggccgactac      960
gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg acccaccagg gcctgtccag ccctgtgacc     1020
5 aagtccttca accggggcga gtgc                                             1044

```

<210> 7

< 211> 352

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Péptido sintético

<400> 7

```

Glu Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15

```

```

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

```


ES 2 657 053 T3

	20		25		30														
Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				
		35					40					45							
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe				
	50					55					60								
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Pro	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr				
65					70					75					80				
Met	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu				
			100					105					110						
Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu				
		115					120						125						
Ala	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser				
	130					135					140								
Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn				
145					150					155					160				
Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly				
				165					170					175					
Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Gln				
			180					185					190						
Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Pro	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met				
		195					200					205							
Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala				
	210					215					220								
Arg	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val				
225					230					235					240				
Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala				
				245					250					255					
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu				
			260					265					270						

ES 2 657 053 T3

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 275 280 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 290 295 300

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 305 310 315 320

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 325 330 335

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 340 345 350

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 8

Glu Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
 115

10 <210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 657 053 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
100 105

<210> 10

< 211> 1056

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 10

gaggcccagc tgggtgcagtc tggcgctgag gtggtcaagc ctggggccag cgtgaagatg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctacaaca tgcaactgggt caagcagacc 120
ccagggcagg gcctggaatg gattggctac atctaccccg gcaacggcgc caccaactac 180
aaccagaagt tccagggcaa ggctaccctg accgccgacc ctagcagcag caccgcctac 240
atgcagatca gcagcctgac cagcgaggac agcgccgtgt acttctgcgc cagaggcgac 300
agcgtgccct tcgcctattg gggccagggc accctgggtca cagtgtctgc tgggtggcga 360
ggatccggcg gaggggaag cgaagcccag ctctccaga gcggagccga ggtcgtgaaa 420
ccaggcgcct ctgtgaagat gtcttgcaag gcctctggct atacctttac ctctataat 480
atgcattggg tcaaacagac acctggacag ggactcgagt ggatcggata tatctatcct 540
ggaaatgggg ccacaaatta caatcagaaa tttcagggga aagccacact gacagccgat 600

10

ES 2 657 053 T3

cccagctcct ccacagccta tatgcagatt agctctctga cctccgagga ctccgccgtg 660
 tatttttgtg cccggggaga ctccgtgcct tttgcttact ggggacaggg cacactcgtg 720
 acagtgtccg ccgcttccac caagggtccc tccgtgtttc ctctggcccc cagcagcaag 780
 agcacctctg gcggaacagc cgccctgggc tgctgtgtca aggactactt ccccgagccc 840
 gtgaccgtgt cttggaactc tggcgccctg acctccggcg tccacacctt tccagccgtg 900
 ctgcagagca gcgccctgta ctctctgagc agcgtcgtga ccgtgcccag cagcagcctg 960
 gggaccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagcccga gcaacaccaa ggtggacaag 1020
 aagggtgaac ccaagagctg cgacaagacc cacacc 1056

<210> 11

< 211> 1113

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Oligonucleótido sintético

<400> 11

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccacag ccaccggcgt gcaactctgag 60
 gccagctgg tgcaagtctg cgctgaggtg gtcaagcctg gggccagcgt gaagatgagc 120
 tgcaaggcca gcggtacac cttcaccagc tacaacatgc actgggtcaa gcagacccca 180
 gggcagggcc tggaatggat tggctacatc taccocggca acggcgccac caactacaac 240
 cagaagtcc agggcaaggc taccctgacc gccgacccta gcagcagcac cgcctacatg 300
 cagatcagca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact tctgcgccag aggcgacagc 360
 gtgcccttcg cctattgggg ccagggcacc ctggtcacag tgtctgctgg tggcggagga 420
 tccggcggag gcggaagcga agcccagctc gtccagagcg gagccgaggt cgtgaaacca 480
 ggcgcctctg tgaagatgct ttgcaaggcc tctggctata cctttacctc ctataatatg 540
 cattgggtca aacagacacc tggacagggc ctcgagtgga tcggatatat ctatcctgga 600
 aatggggcca caaattacaa tcagaaattt caggggaaag ccacactgac agccgatccc 660
 agctcctcca cagcctatat gcagattagc tctctgacct ccgaggactc cgccgtgtat 720
 ttttgtgccc ggggagactc cgtgcctttt gcttactggg gacagggcac actcgtgaca 780
 gtgtccgccg ctccaccaa gggcccctcc gtgtttctc tggccccag cagcaagagc 840
 acctctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgagcccgtg 900
 accgtgtctt ggaactctgg cgccctgacc tccggcgtcc acacctttcc agccgtgctg 960
 cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtctgaccg tgcccagcag cagcctgggg 1020
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 1080
 gtggaacca agagctgcga caagaccac acc 1113

10 <210> 12

< 211> 231

< 212> PRT

ES 2 657 053 T3

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido sintético

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Glu Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro
115 120 125

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
130 135 140

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu
145 150 155 160

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln
165 170 175

Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr
180 185 190

Ala Tyr Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
195 200 205

Phe Cys Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
210 215 220

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
225 230

<210> 13

< 211> 8

5

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido sintético

5 <400> 13

Gly Gly His His His His His His
1 5

<210> 14

< 211> 11

< 212> PRT

10 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Péptido sintético

<400> 14

Gly Gly Cys Gly Gly His His His His His His
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente al sialoglicotopo de MUC1 asociado al tumor CA6, caracterizada por que la proteína de unión similar a anticuerpo comprende dos polipéptidos que tienen las estructuras representadas por las fórmulas [I] y [II] a continuación:

5	$V_{L1-L1}-V_{L2}-C_L$	[I]
	$V_{H1-L2}-V_{H2}-C_{H1}$	[II]

en las que:

V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

10 V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina IGKC humana;

15 C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de una inmunoglobulina humana;

L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos; y

en la que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una proteína de unión similar a un anticuerpo de inmunoglobulina en tándem monoespecífica bivalente, en la que el polipéptido de fórmula [I] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 1, y el polipéptido de fórmula [II] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 7.

20

2. La proteína de unión similar a un anticuerpo según la reivindicación 1, en la que V_{L1} y V_{L2} se definen por la secuencia SEQ ID NO: 2, y V_{H1} y V_{H2} se definen por la secuencia SEQ ID NO: 8.

3. La proteína de unión similar a un anticuerpo según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que L_1 es GGGGS o GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3).

25 4. La proteína de unión similar a un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que L_2 es GGGGS o GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3).

5. La proteína de unión similar a un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido de fórmula [I] comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

30 6. La proteína de unión similar a un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el polipéptido de fórmula [II] comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

7. La proteína de unión similar a un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además al menos un radiomarcador, agente formador de imágenes, agente terapéutico, o agente de diagnóstico.

35 8. La proteína de unión similar a un anticuerpo según la reivindicación 7, en la que el radiomarcador, agente formador de imágenes, agente terapéutico, o agente de diagnóstico es ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$, o ^{83}Sr .

9. La proteína de unión similar a un anticuerpo según la reivindicación 7 u 8, en la que el radiomarcador, agente formador de imágenes, agente terapéutico, o agente de diagnóstico comprende uno o más agentes para una plataforma de formación de imágenes seleccionada del grupo que consiste en formación de imágenes de resonancia magnética (MRI); tomografía de emisión de positrones (PET); tomografía de emisión monofotónica (SPECT); formación de imágenes ópticas, tomografía computerizada (CT); formación de imágenes con ultrasonidos, rayos X y fotoacústicas.

40

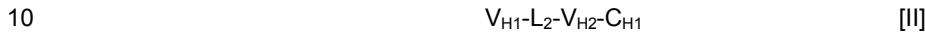
10 Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica los polipéptidos de fórmula [I] y [II] de la proteína de unión similar a un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

45 11. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 10, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 10.

12. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 10 u 11.

13. Una célula hospedante que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 10 u 11, o el vector de expresión como se define en la reivindicación 12.

5 14. Un método para obtener una proteína de unión similar a un anticuerpo que se une específicamente al sialoglicotopo de MUC1 asociado al tumor CA6, que comprende expresar en una célula una o más moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que tienen las estructuras representadas por las fórmulas a continuación [I] y [II]:



en las que:

V_{L1} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{L2} es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

V_{H1} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

15 V_{H2} es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina derivado del anticuerpo DS6;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina IGKC humana;

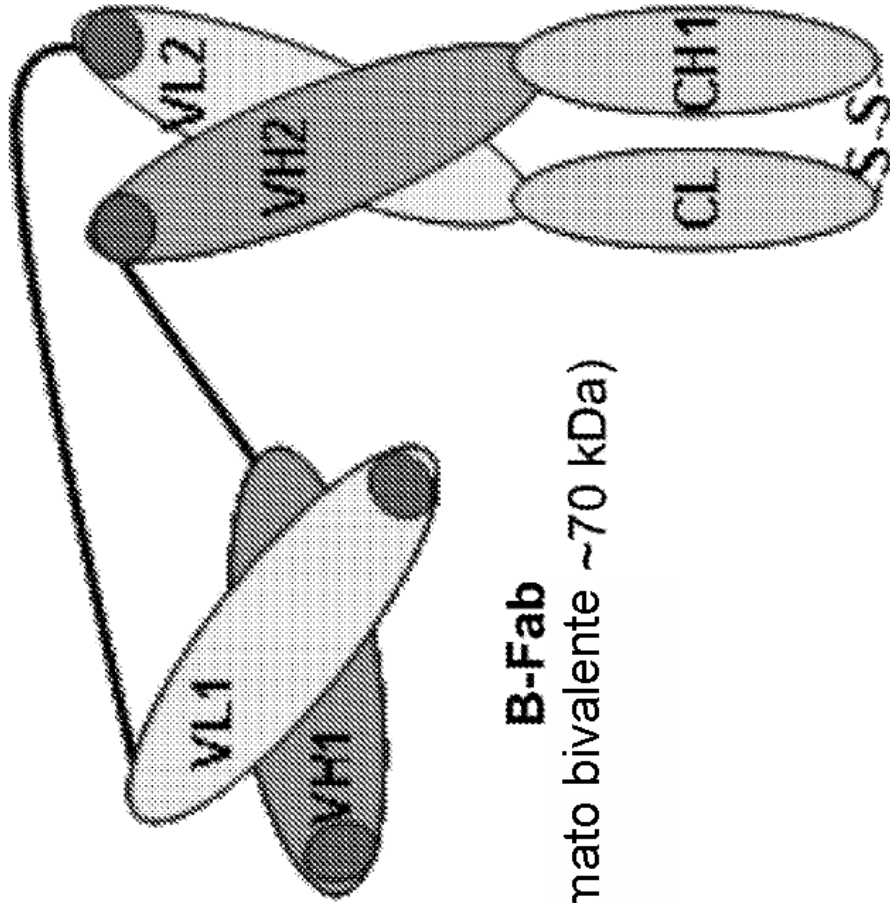
C_{H1} es un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina, tal como un dominio constante de cadena pesada C_{H1} de una inmunoglobulina humana;

20 L_1 y L_2 son enlazadores de aminoácidos;

en el que los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman una proteína de unión similar a un anticuerpo de inmunoglobulina en tándem mono-específica bivalente; y

en el que el polipéptido de fórmula [I] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 1, y el polipéptido de fórmula [II] comprende una secuencia al menos 80% idéntica a SEQ ID NO: 7.

25 15. El método según la reivindicación 14 en el que V_{L1} y V_{L2} se definen por la secuencia SEQ ID NO: 2; y V_{H1} y V_{H2} se definen por secuencia SEQ ID NO: 8.



B-Fab
(formato bivalente ~70 kDa)

FIGURA 1

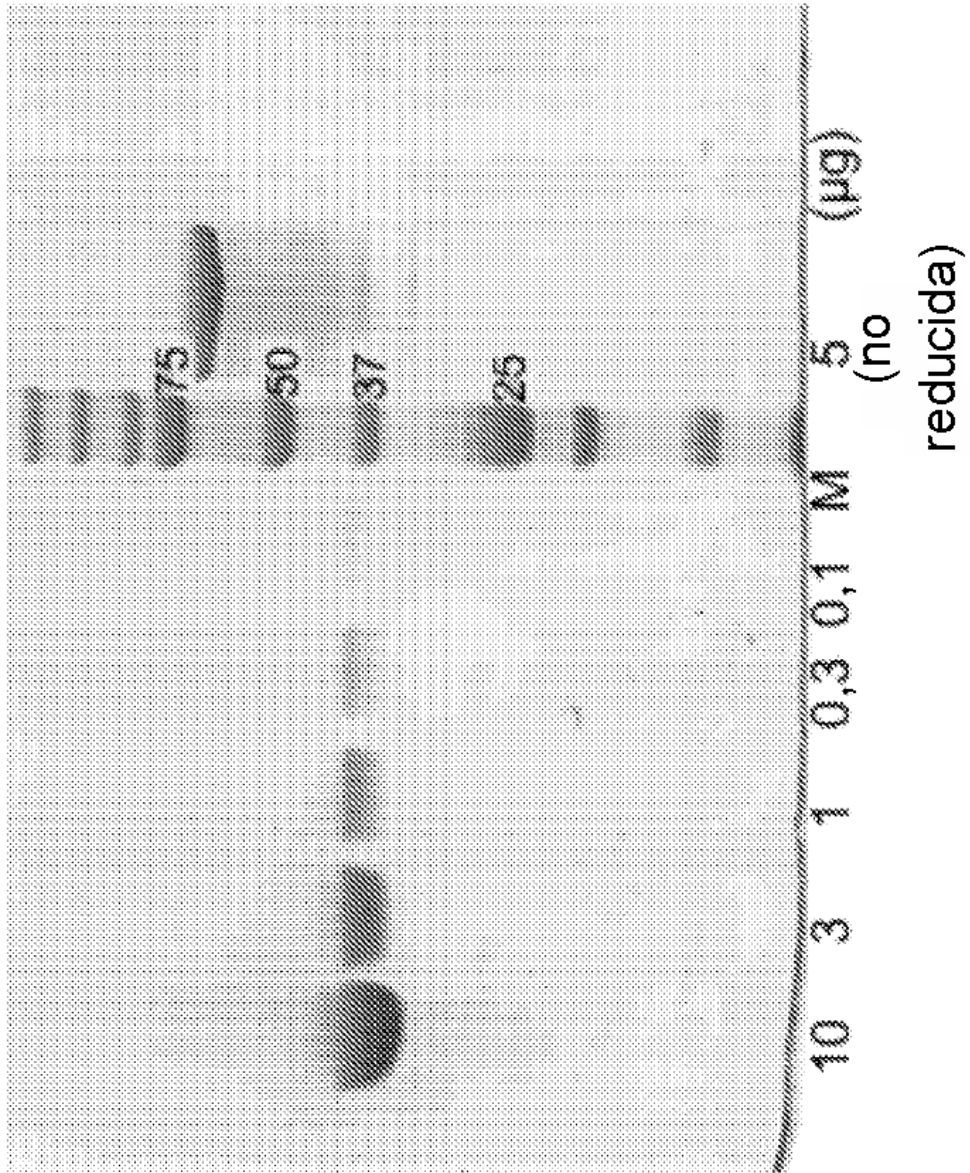


FIGURA 2A

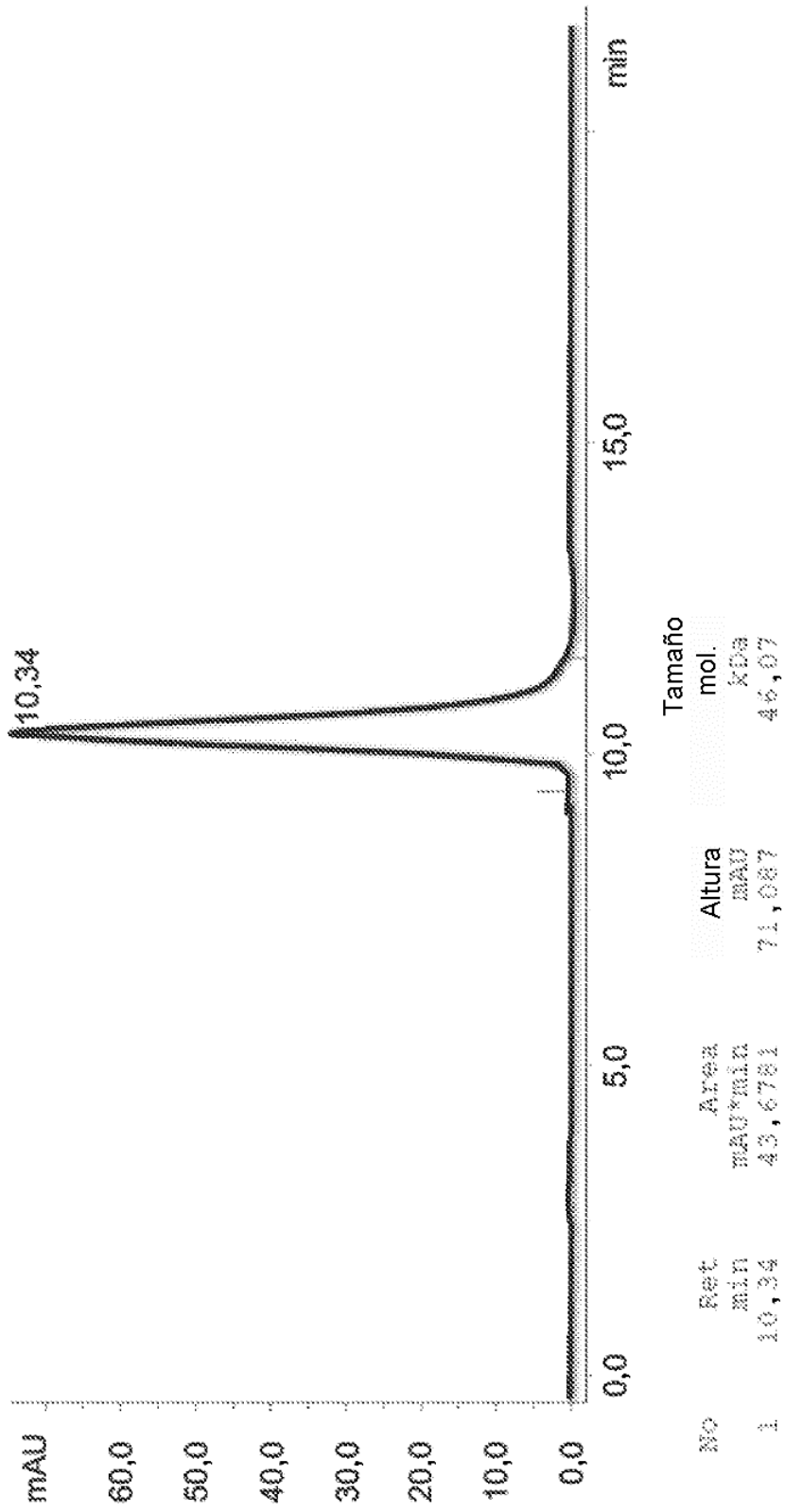


FIGURA 2B

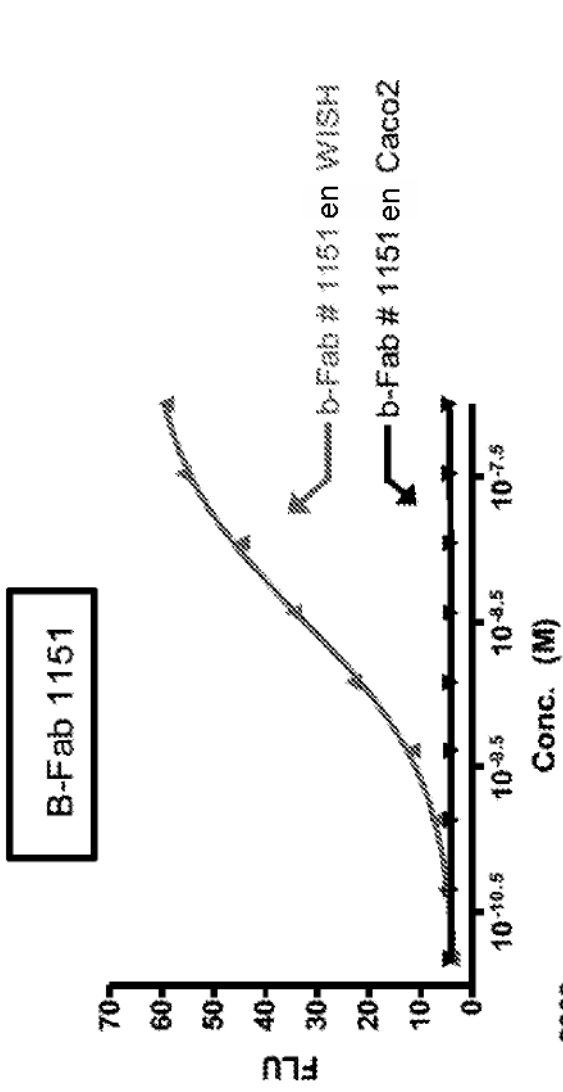


FIGURA 2C

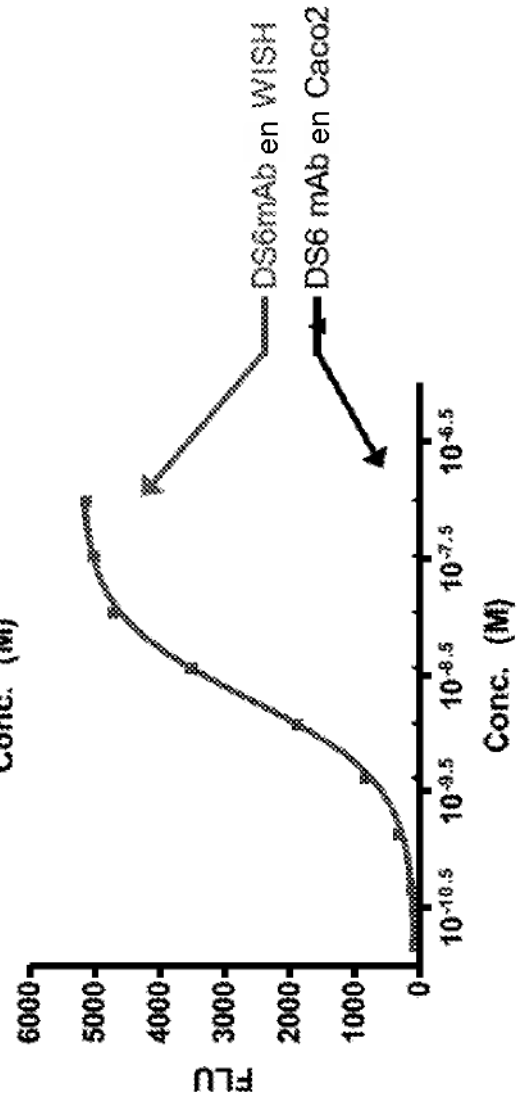


FIGURA 2D

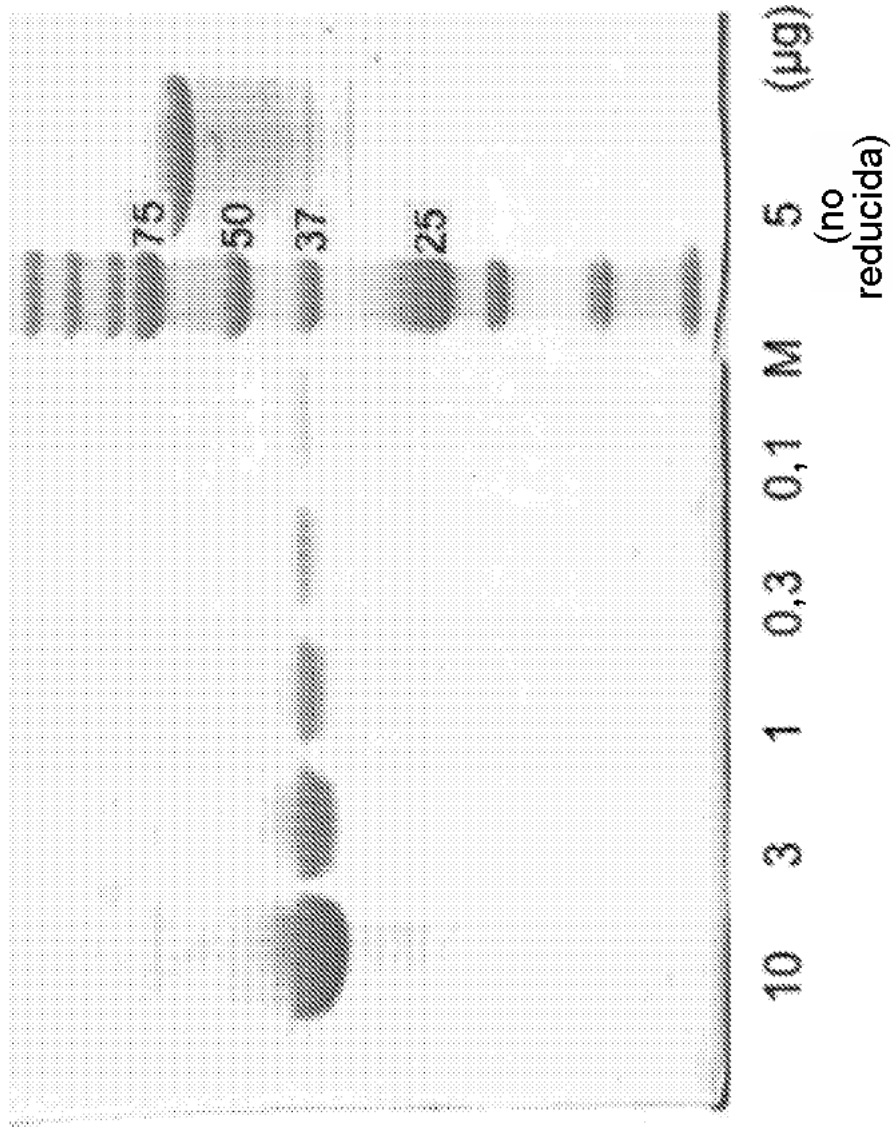


FIGURA 3A

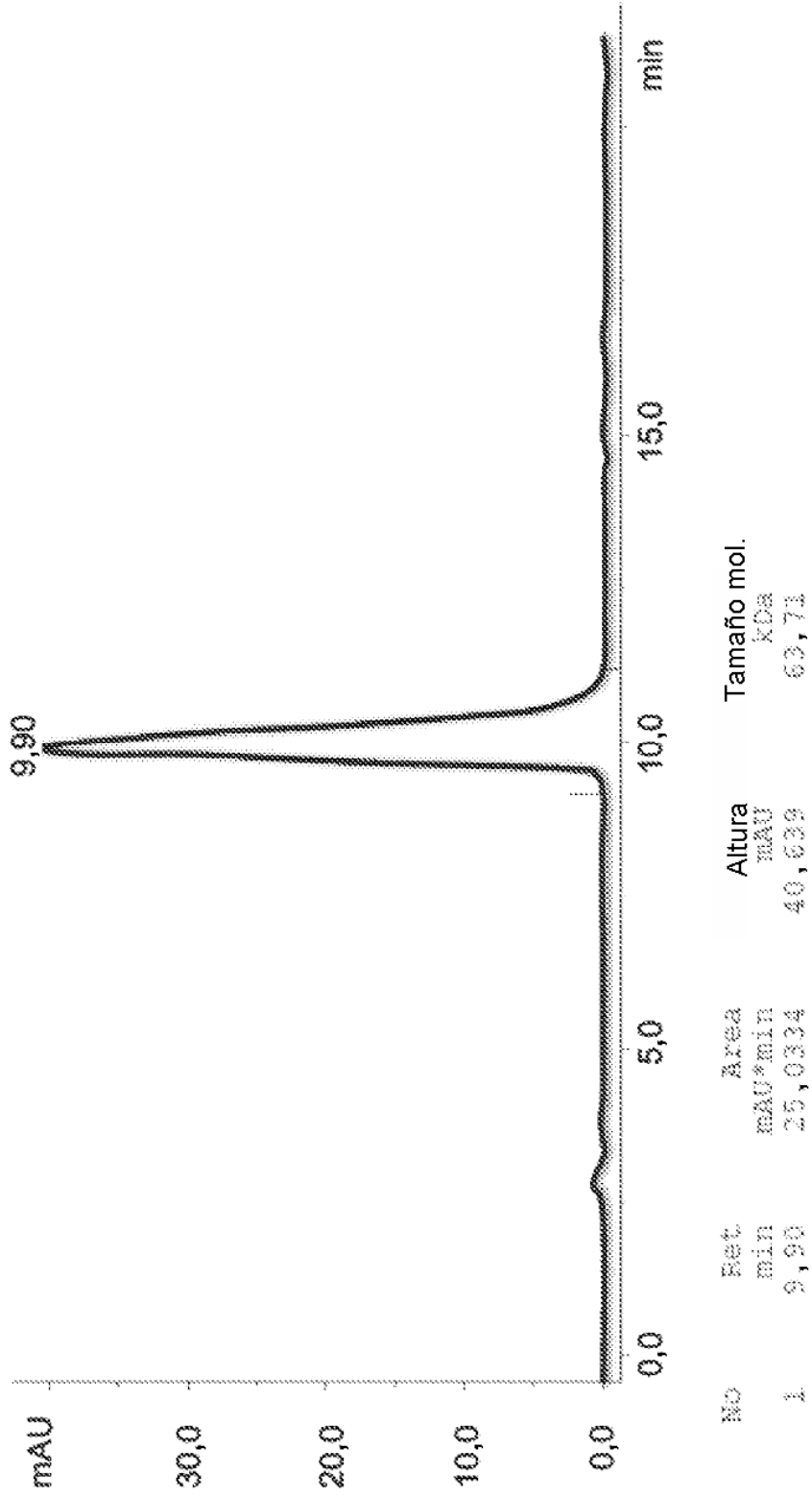


FIGURA 3B

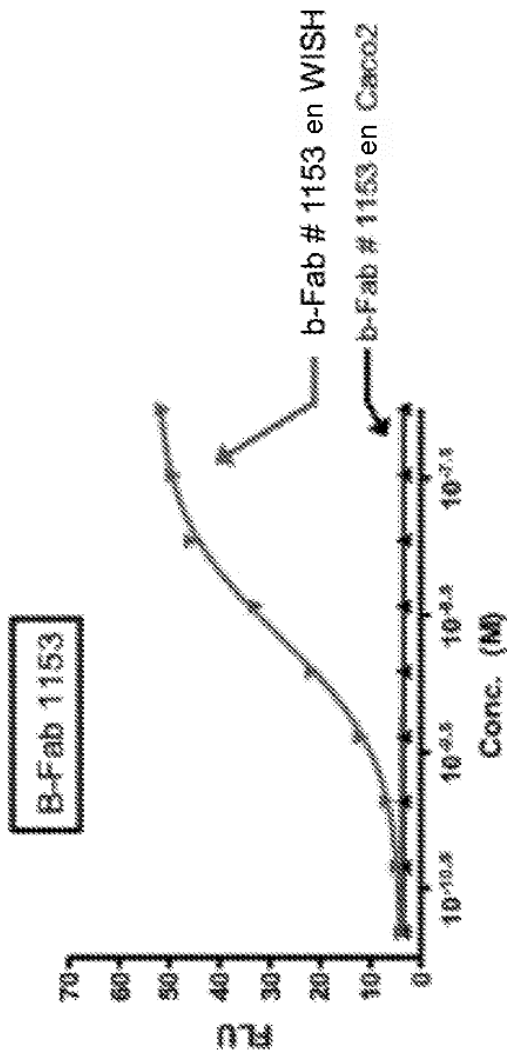


FIGURA 3C

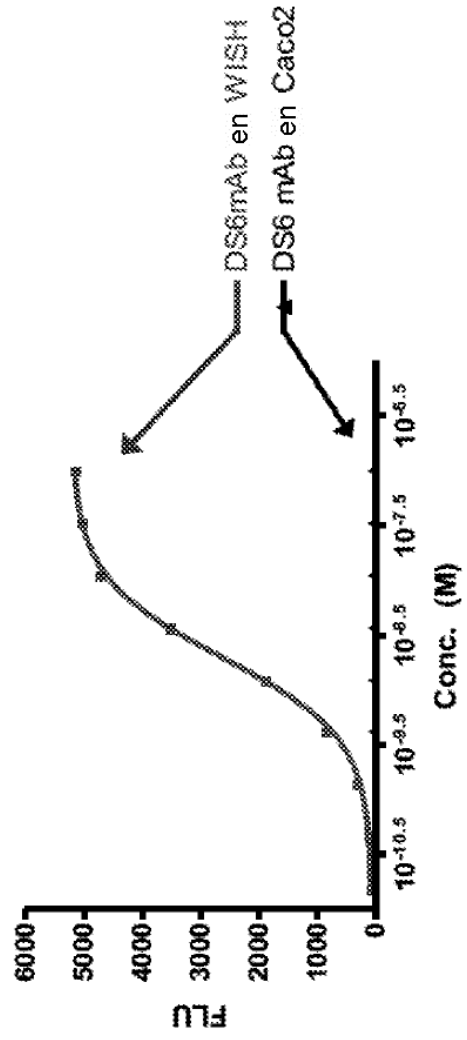


FIGURA 3D

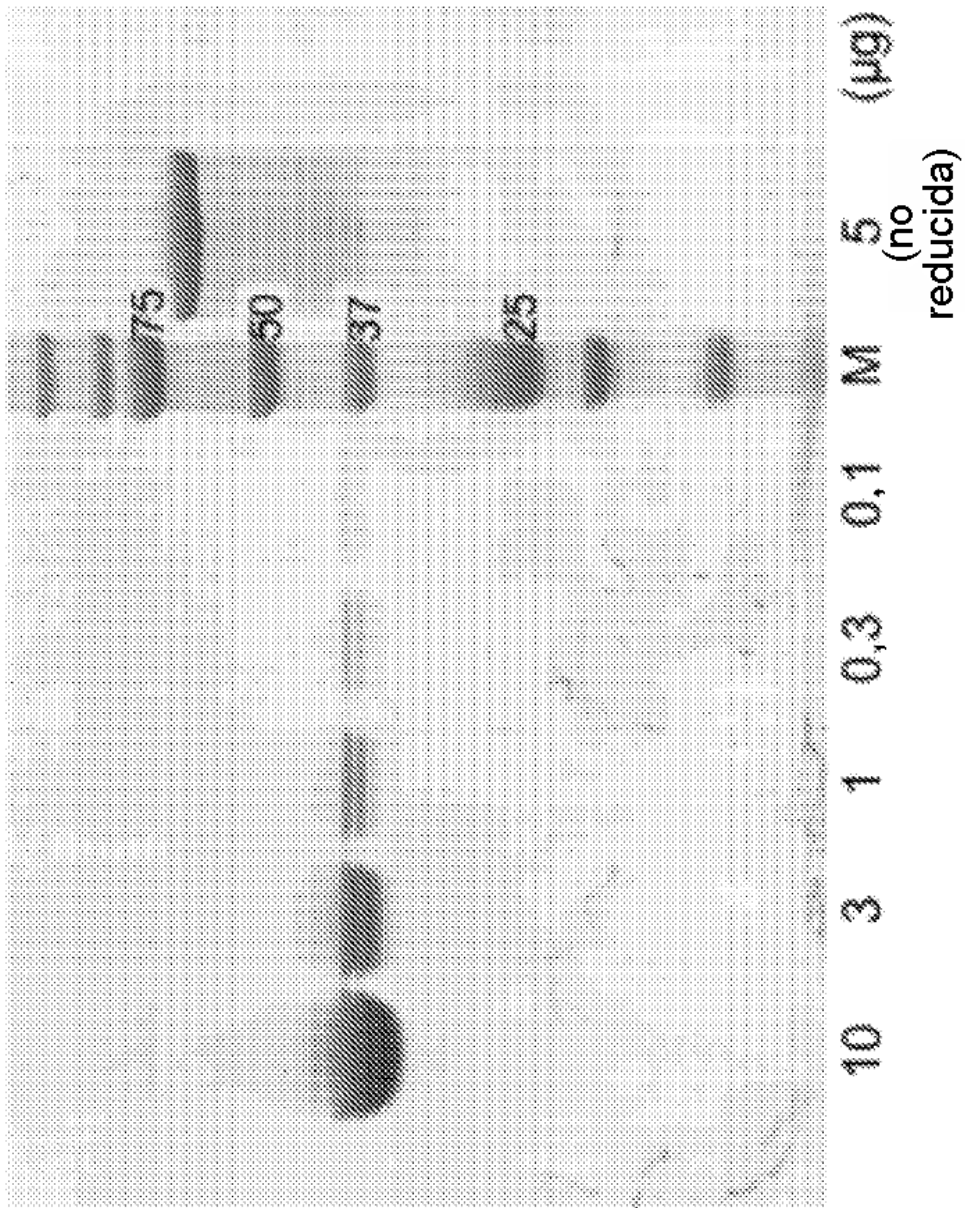


FIGURA 4

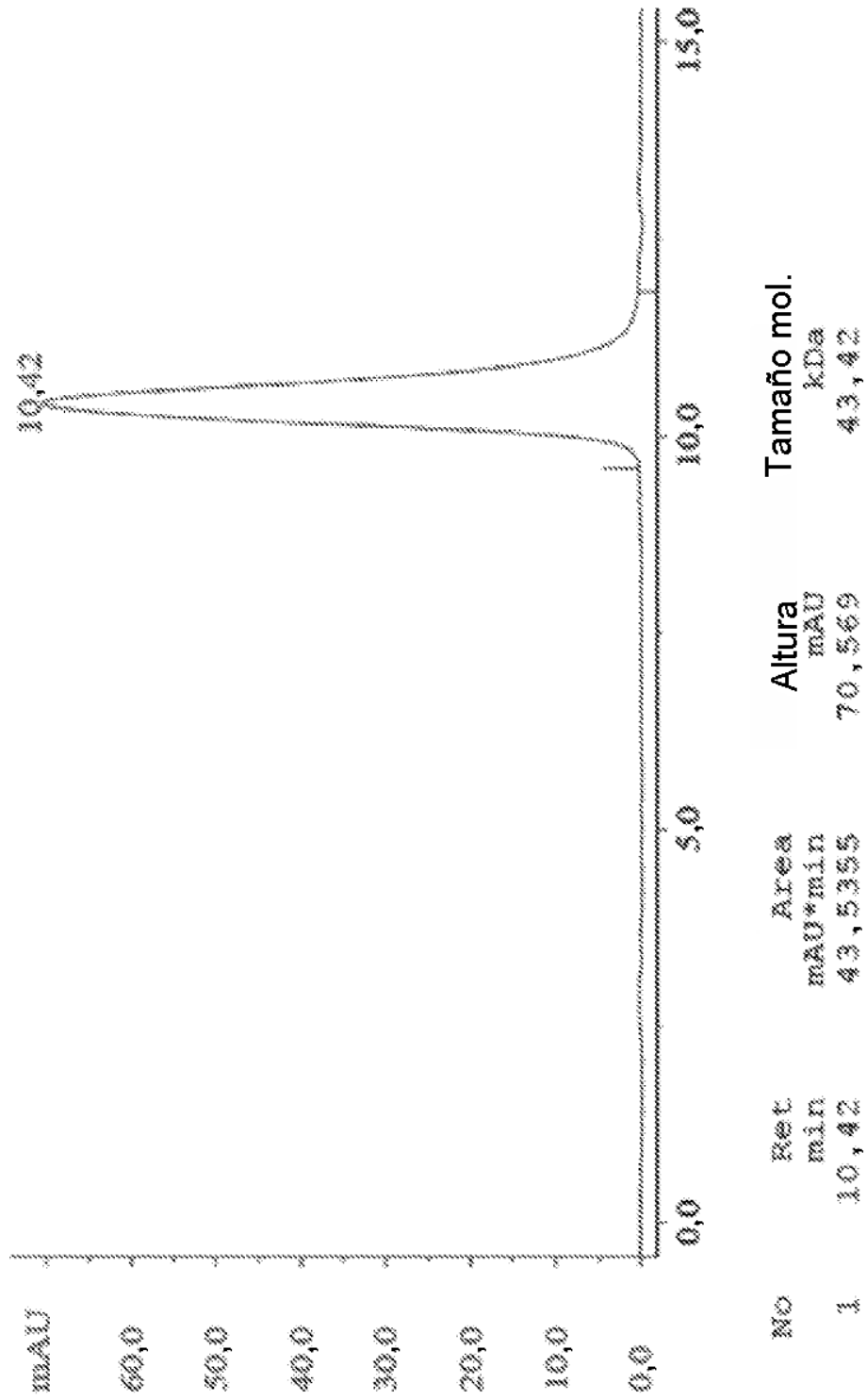


FIGURA 4B

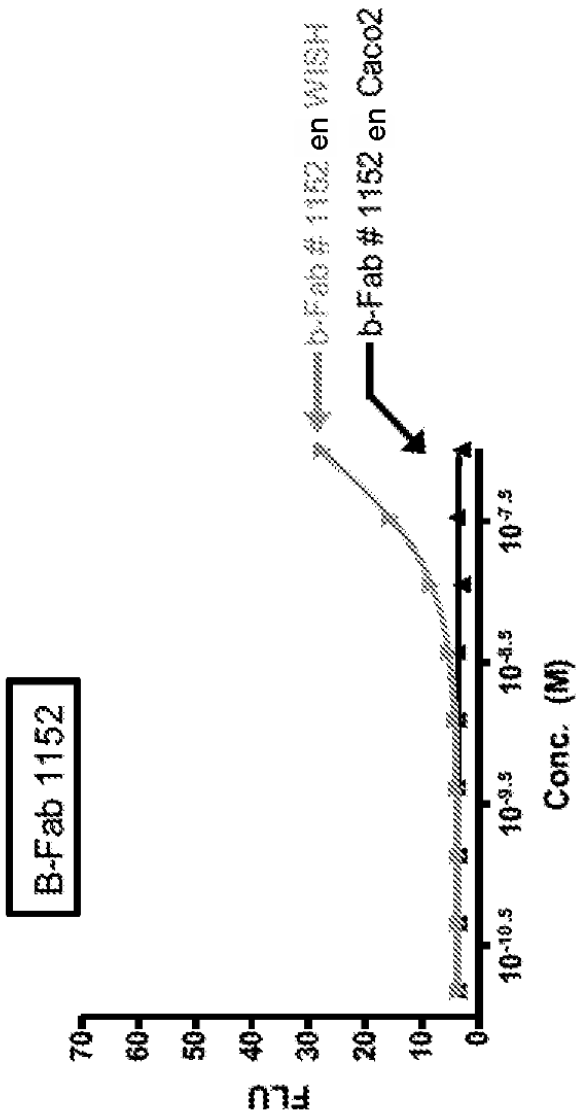


FIGURA 4C

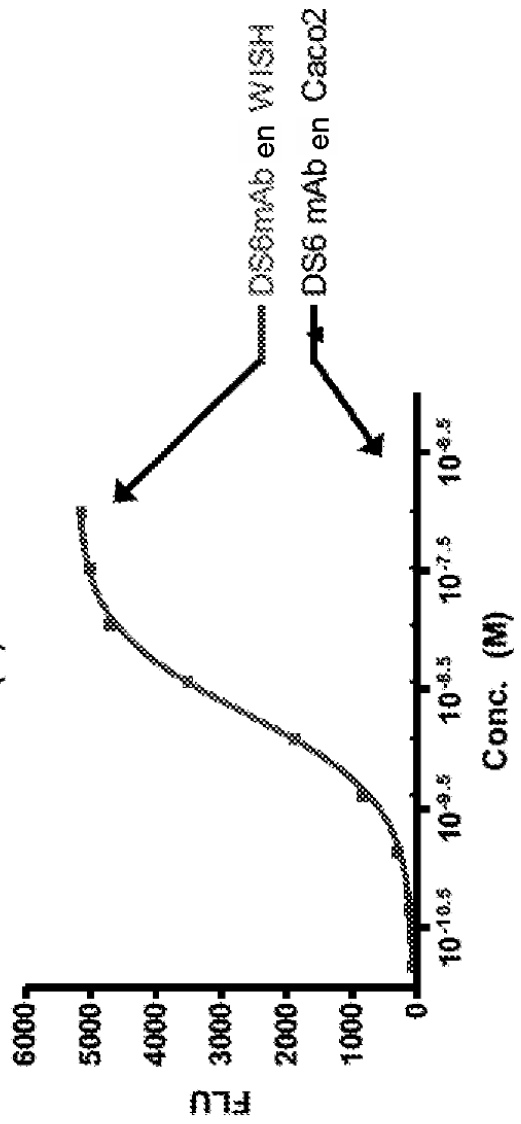


FIGURA 4D

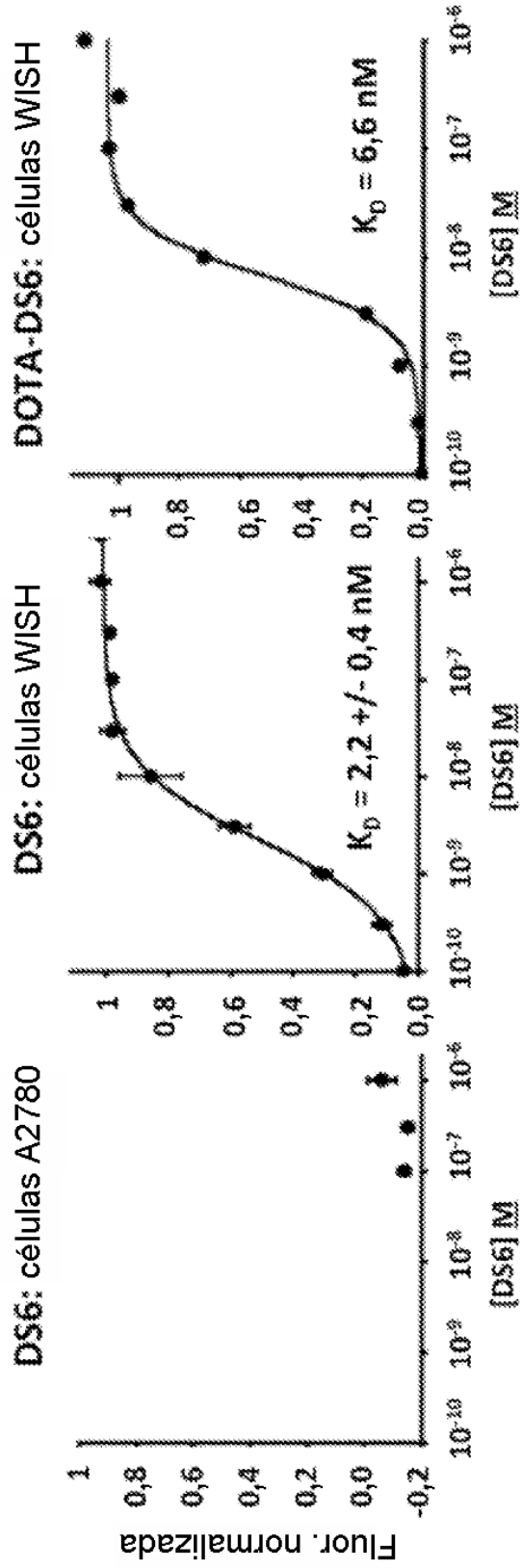


FIGURA 5A

FIGURA 5B

FIGURA 5C

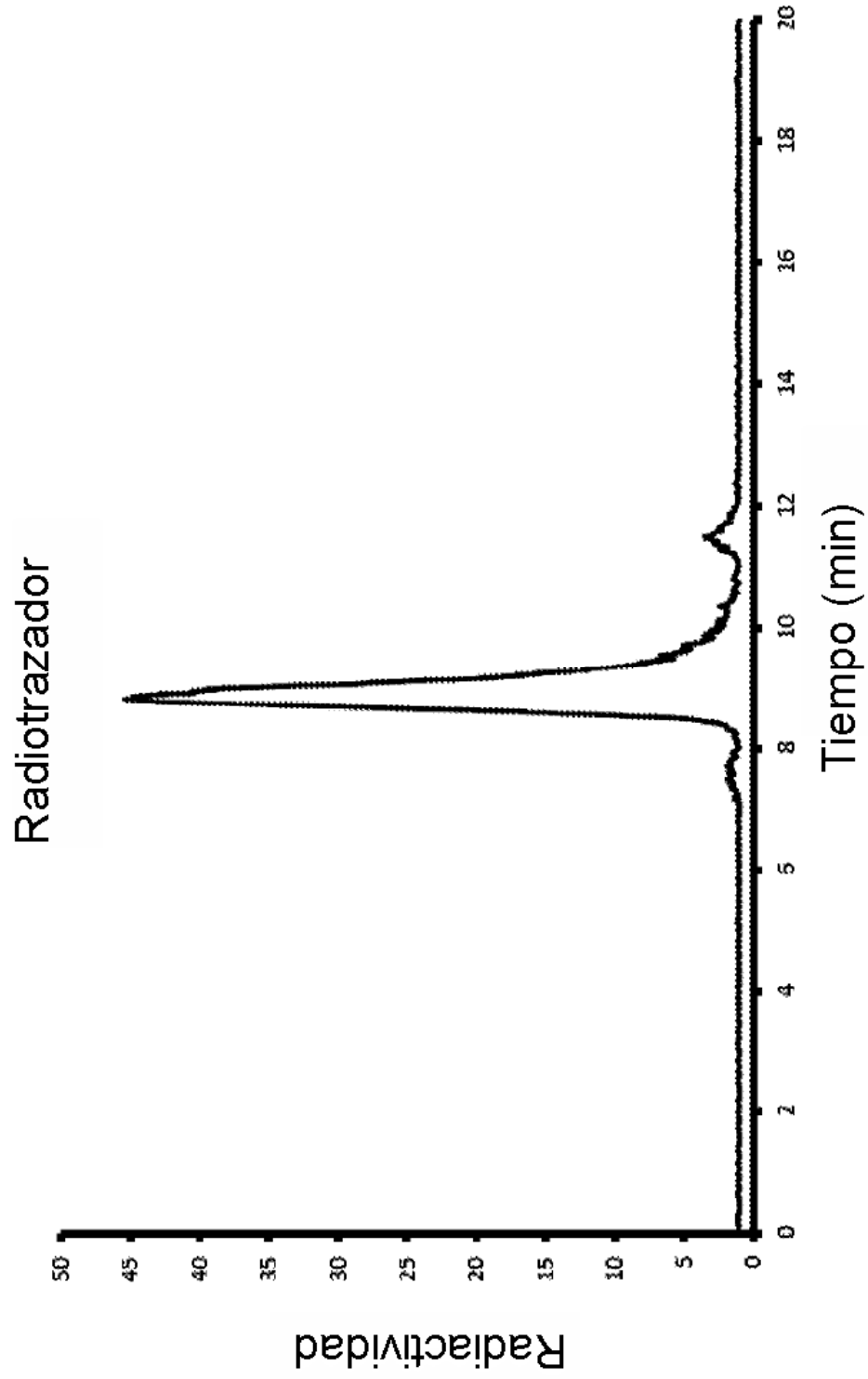


FIGURA 6A

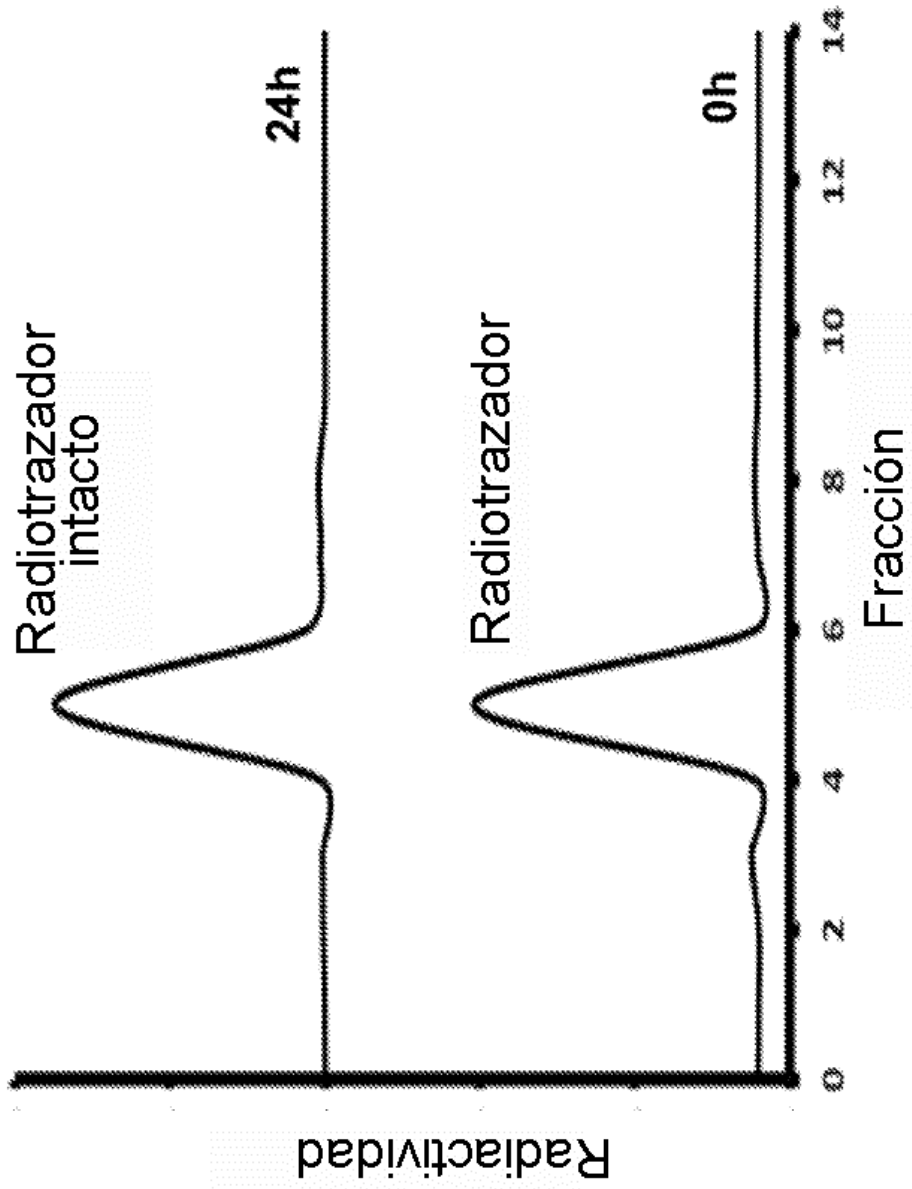
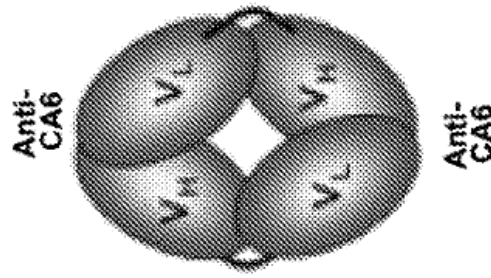


FIGURA 6B

Diacuerpo específico de DS6



Diacuerpo
(~50 kDa)

B-Fac específico de DS6

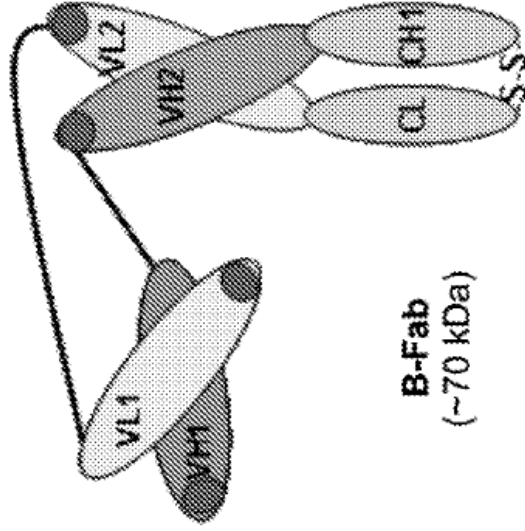


FIGURA 7A

FIGURA 7B