

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 274**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2008 E 14154498 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2769991**

54 Título: **Dirección de anticuerpos mediante un dominio de reconocimiento modular**

30 Prioridad:

03.01.2008 US 18816 P

22.01.2008 US 22767 P

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

13.11.2018

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
Mail Drop TPC-8 10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

BARBAS III, CARLOS, F.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 689 274 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

Dirección de anticuerpos mediante un dominio de reconocimiento modular

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere en líneas generales a anticuerpos que contienen uno o más dominios de reconocimiento modulares y más específicamente a anticuerpos que contienen uno o más dominios de reconocimiento modulares para su uso en el tratamiento de una enfermedad, y métodos de generación de anticuerpos que contienen uno o más dominios de reconocimiento modulares.

10 Antecedentes

15 Pueden usarse anticuerpos (Ab) monoclonales catalíticamente activos para la activaciones electiva de profármacos y transformaciones químicas. Los Ab monoclonales con actividad aldolasa han surgido como catalizadores altamente eficaces para varias transformaciones químicas, particularmente reacciones aldol y *retro*-aldol. La actividad retro-aldolasa de los Ab, tales como 38C2 y 93F3, ha permitido a los investigadores diseñar, sintetizar y evaluar profármacos de diversos agentes quimioterapéuticos que pueden activarse por reacciones *retro*-aldol. (La construcción de 38C2 se describió en el documento WO 97/21803). 38C2 contiene un sitio de combinación de anticuerpo que cataliza la reacción de adición de aldol entre un donador alifático y un aceptador de aldehído. En un modelo de ratón singénico de neuroblastoma, la administración sistémica de un profármaco de etopósido y la inyección intratumoral de 38C2 inhibía el crecimiento tumoral.

25 Un inconveniente en el uso de los Ab catalíticos es que carecen de un dispositivo para dirigir el Ab catalítico a las células malignas. Estudios previos demostraron que en una estrategia de tratamiento con profármaco enzimático dirigido por anticuerpo (ADEPT) o tratamiento con profármaco de abzima dirigido por anticuerpo (ADAPT), las enzimas o los anticuerpos catalíticos pueden dirigirse a las células tumorales por conjugación química o fusión recombinante con anticuerpos de dirección. Sin embargo, una alternativa más eficaz sería usar el anticuerpo catalítico fusionado a un péptido de dirección ubicado fuera del sitio de combinación de anticuerpo, dejando de ese modo el sitio activo disponible para la activación del profármaco. Por ejemplo, la fusión de Ab 38C2 a un péptido de unión a integrina $\alpha\beta 3$ localizaría de forma selectiva el anticuerpo en el tumor y/o la vasculatura del tumor y desencadenaría la activación del profármaco en ese sitio. El tratamiento potencial de esta estrategia está apoyado por los datos preclínicos y clínicos en fase III que sugieren que los péptidos pueden convertirse en fármacos viables mediante fusión a regiones Fc de anticuerpo.

35 El desarrollo de anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos que abordan dos o más dianas de cáncer simultáneamente y/o activan profármacos ofrece una solución novedosa y prometedora para atacar al cáncer y a otras enfermedades. Dichos anticuerpos se ejemplifican en la figura 1 de la presente solicitud. Los estudios de anticuerpos biespecíficos (BsAb) que abordan simultáneamente dos antígenos asociados a tumor (por ejemplo, receptores del factor de crecimiento) para la regulación por disminución de múltiples rutas de proliferación celular/supervivencia ha proporcionado apoyo a esta estrategia. Tradicionalmente, los anticuerpos biespecíficos se han preparado por unión química de dos anticuerpos monoclonales diferentes o por fusión de dos líneas celulares de hibridoma para producir un hibridoma híbrido. Se han diseñado moléculas de tipo IgG de doble especificidad, tetravalentes o inmunoglobulinas de doble dominio variable a partir de dos anticuerpos monoclonales. Las inmunoglobulinas de doble dominio variable pueden unirse a ambos antígenos en presencia de suero. Sin embargo, estas estrategias presentan problemas con respecto a la fabricación, rendimiento y pureza.

50 Se ha desarrollado una diversidad de métodos recombinantes para la producción eficaz de pequeños fragmentos BsAb tales como diacuerpos, minicuerpos y proteínas de fusión Fab-scFv. Estos fragmentos BsAb pueden poseer algunas ventajas sobre las moléculas de tipo IgG de longitud completa para determinadas aplicaciones clínicas, tales como para radiomágenes de tumores y dirección, a causa de la mejor penetración tisular y la eliminación más rápida de la circulación. Por otro lado, el BsAb de tipo IgG puede resultar preferido sobre los fragmentos BsAb más pequeños para otras aplicaciones *in vivo*, específicamente para indicaciones de oncología, proporcionando el dominio Fc que confiere larga semivida en suero y mantiene la función inmunitaria secundaria, tal como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad mediada por el complemento. A diferencia de sus equivalentes de fragmento, el diseño y la producción de BsAb de tipo IgG recombinantes ha sido, sin embargo, bastante problemático técnicamente debido a su gran tamaño (-150-200 kDa) y la complejidad estructural. El éxito en el campo, juzgado por la aplicación satisfactoria en modelos animales, ha sido muy limitado. Recientemente, con el examen de una diversidad de construcciones, la expresión eficaz de moléculas BsAb que contienen el dominio Fc en células de mamífero ha hecho algunos progresos.

65 Otra estrategia que se ha usado para dirigir anticuerpos es mediante el uso de pepticuerpos. Los pepticuerpos son esencialmente fusiones peptídicas con regiones Fc de anticuerpo. Dado el éxito de los estudios usando colecciones aleatorias de péptidos para encontrar ligandos peptídicos de alta afinidad para una amplia diversidad de dianas, la fusión de dichos péptidos a regiones Fc de anticuerpo proporciona un medio de generación de péptidos en candidatos terapéuticos aumentando su semivida en circulación y la actividad mediante valencia aumentada.

Las interacciones de las proteínas con otras moléculas es una cuestión básica en bioquímica. Las interacciones de las proteínas incluyen interacciones de receptor-ligando, interacciones de anticuerpo-antígeno, contacto célula-célula e interacciones de patógenos con tejidos diana. Las interacciones de las proteínas pueden implicar el contacto con otras proteínas, con carbohidratos, oligosacáridos, lípidos, iones metálicos y materiales similares. La unidad básica de interacción de proteínas es la región de la proteína implicada en el contacto y en el reconocimiento, y se menciona como el sitio de unión o el sitio diana.

Los péptidos obtenidos de colecciones de presentación en fagos típicamente retienen sus características de unión cuando se unen a otras moléculas. Los péptidos específicos de este tipo pueden tratarse como bloques de especificidad modulares o dominios de reconocimiento molecular (MRD) que pueden combinarse para crear una única proteína con especificidades de unión por varias dianas definidas.

Un ejemplo de dicho sitio diana definido es la integrina. Las integrinas son una familia de receptores de adhesión celular transmembranarias que están compuestos de subunidades α y β y median la adhesión celular a proteínas dentro de la matriz extracelular. Actualmente, se conocen ocho subunidades α y ocho β ; estas forman 24 heterodímeros diferentes $\alpha\beta$ con diferentes especificidades por diversas proteínas de adhesión celular de ECM. Los ligandos para diversas integrinas incluyen fibronectina, colágeno, laminina, factor de von Willebrand, osteopontina, trombospondina y vitronectina, que son todos componentes de la ECM. Determinadas integrinas también pueden unirse a ligandos solubles tales como fibrinógeno o a otras moléculas de adhesión en células adyacentes. Se sabe que las integrinas existen en distintos estados de activación que muestran diferentes afinidades por el ligando. El reconocimiento de ligandos solubles por las integrinas depende estrictamente de cambios específicos en la conformación del receptor. Esto proporciona un cambio molecular que controla la capacidad de las células de agregarse de una manera dependiente de integrina y de detenerse en las condiciones de flujo dinámico de la vasculatura. Este mecanismo está bien establecido para leucocitos y plaquetas que circulan dentro del torrente sanguíneo en un estado de reposo mientras están expresando integrinas no activadas. Tras la estimulación mediante agonistas proinflamatorios o protrombóticos, estos tipos celulares responden rápidamente con varios cambios moleculares incluyendo en cambio de integrinas clave, integrinas $\beta 2$ para leucocitos y $\alpha v\beta 3$ para plaquetas, de conformaciones de "reposo" a "activadas". Esto posibilita que estos tipos celulares se detengan dentro de la vasculatura, promoviendo la cohesión celular y dando lugar a la formación de trombos.

Se ha demostrado que un subconjunto metastásico de células de cáncer de mama humano expresa integrina $\alpha v\beta 3$ en una forma constitutivamente activada. Esta expresión aberrante de $\alpha v\beta 3$ desempeña una función en la metástasis del cáncer de mama, así como del cáncer de próstata, melanoma tumores neuroblásticos. El receptor activado promueve fuertemente la migración de células cancerosas y posibilita que las células se detengan en condiciones de flujo sanguíneo. De esta manera, la activación de $\alpha v\beta 3$ confiere a las células metastásicas propiedades clave que probablemente son críticas para la diseminación satisfactoria y la colonización de órganos diana. Las células tumorales que han entrado satisfactoriamente en el órgano diana pueden utilizar además $\alpha v\beta 3$ para prosperar en nuevo entorno, ya que las interacciones de la matriz con $\alpha v\beta 3$ pueden promover la supervivencia celular y la proliferación. Por ejemplo, la unión de $\alpha v\beta 3$ a osteopontina promueve malignidad y niveles elevados de osteopontina se correlacionan con un mal pronóstico en cáncer de mama.

Por estas razones, y por su función establecida en la angiogénesis, la integrina $\alpha v\beta 3$ es una de las integrinas más ampliamente estudiadas. Los antagonistas de esta molécula tienen potencial significativo para su uso en suministro de fármacos dirigido. Una estrategia que se ha usado para dirigir integrina $\alpha v\beta 3$ usa la alta especificidad de unión a $\alpha v\beta 3$ de péptidos que contienen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). Este tripéptido, presente de forma natural en proteínas de la matriz extracelular, es el sitio de unión principal de la integrina $\alpha v\beta 3$. Sin embargo, las sondas indicadoras basadas en RGD son problemáticas debido a una rápida eliminación de la sangre, una elevada captación por el riñón y el hígado y una rápida eliminación tumoral. La modificación química de péptidos RGD ciclados ha demostrado aumentar su estabilidad y valencia. Estos péptidos modificados entonces se acoplan a radioisótopos y se usan para imágenes tumorales o para inhibir el crecimiento tumoral.

La integrina $\alpha v\beta 3$ es uno de los heterodímeros de integrina mejor caracterizados y es uno de los varios heterodímeros que se ha implicado en la angiogénesis inducida por tumor. Aunque se expresa escasamente en vasos sanguíneos maduros, $\alpha v\beta 3$ se regula por aumento significativamente durante la angiogénesis *in vivo*. La expresión de $\alpha v\beta 3$ se correlaciona con la agresividad de la enfermedad en cáncer de mama y cervicouterino, así como en melanoma maligno. Los estudios recientes sugieren que $\alpha v\beta 3$ puede ser útil como indicador de diagnóstico o de pronóstico para algunos tumores. La integrina $\alpha v\beta 3$ es particularmente atractiva como diana terapéutica debido a su distribución celular relativamente limitada. No se expresa generalmente en células epiteliales, y se expresa mínimamente en otros tipos celulares. Además, los antagonistas de $\alpha v\beta 3$, incluyendo tanto péptidos RGD cíclicos como anticuerpos monoclonales, inhiben significativamente la angiogénesis inducida por citocina y el crecimiento de tumor sólido en la membrana corioalantoica de pollo.

Otro heterodímero de integrina, $\alpha v\beta 5$, se expresa más ampliamente en células tumorales malignas y está implicada probablemente en la angiogénesis mediada por VEGF. Se ha demostrado que $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ promueven la angiogénesis mediante distintas rutas: $\alpha v\beta 3$ a través de bFGF y TNF- α , y $\alpha v\beta 5$ a través de VEGF y TGF- α . Se ha demostrado que la inhibición de la cinasa Src puede bloquear la angiogénesis inducida por VEGF, pero no la

inducida por FGF2. Estos resultados implican fuertemente que FGF2 y VEGF activan diferentes rutas angiogénicas que requieren $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$, respectivamente.

Las integrinas también se han implicado en la metástasis tumoral. La metástasis es la causa principal de morbilidad y mortalidad en cáncer. La progresión maligna de melanoma, glioma, cáncer de ovario y de mama se han ligado todas fuertemente con la expresión de la integrina $\alpha\beta 3$ y en algunos casos con $\alpha\beta 5$. Más recientemente, se ha demostrado que la activación de la integrina $\alpha\beta 3$ desempeña una función significativa en la metástasis en cáncer de mama humano. Una correlación muy fuerte entra la expresión de $\alpha\beta 3$ y metástasis de cáncer de mama se ha indicado cuando los epitelios de mama normales son negativos a $\alpha\beta 3$ y aproximadamente un 50 % de los carcinomas lobulares invasivos y casi todas las metástasis óseas en cáncer de mama expresan $\alpha\beta 3$. El antagonismo de $\alpha\beta 3$ con un péptido cíclico ha demostrado sinergizar con radioinmunoterapia en estudios que implican xenoinjertos de cáncer de mama.

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes, es esencial para los procesos fisiológicos y patológicos. Normalmente, la angiogénesis está estrechamente regulada por factores pro y antiangiogénicos, aunque en el caso de enfermedades tales como cáncer, enfermedad neovascular ocular, artritis y psoriasis, el proceso puede salir mal. La asociación de la angiogénesis con enfermedad ha generado el descubrimiento de un compuesto antiangiogénico atractivo. El péptido antiangiogénico derivado de fagos más prometedor descrito hasta la fecha, desarrollado por Amgen, neutraliza la citocina angiogénica Ang2.

Aunque los VEGF y sus receptores han estado entre las moléculas más ampliamente abordadas en el campo de la angiogénesis, los esfuerzos preclínicos dirigidos a la ruta de angiopoyetina-Tie2 más recientemente descubierta están en curso. Ambas familias de proteína implican interacciones de receptor y ligando, y ambas incluyen miembros cuyas funciones están en gran medida restringidas de forma posnatal a células endoteliales y algunos linajes de células madre hematopoyéticas. Tie-2 es un receptor tirosina cinasa con cuatro ligandos conocidos, angiopoyetina-1 (Ang1) a angiopoyetina-4 (Ang4), siendo los mejor estudiados Ang1 y Ang2. Ang1 estimula la fosforilación de Tie2 y la interacción de Ang2 con Tie2 ha demostrado antagonizar y también agonizar la fosforilación del receptor Tie2. La expresión elevada de Ang2 en sitios de angiogénesis normal y angiogénesis posnatal patológica implica de forma circunstancial una función proangiogénica para Ang2. La inducción de Ang2 selectiva de vaso asociada con angiogénesis se ha demostrado en enfermedades incluyendo el cáncer. En pacientes con carcinoma de colon, Ang2 se expresa de forma ubicua en epitelio tumoral, mientras que la expresión de Ang1 en epitelio tumoral ha demostrado ser infrecuente. La ganancia neta de actividad de Ang2 se ha sugerido como un factor iniciador para la angiogénesis tumoral.

Otras proteínas de fusión dirigidas a receptores celulares están en evaluación clínica. Herceptin (Trastuzumab), desarrollado por Genentech, es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante dirigido contra el dominio extracelular del receptor 2 tirosina cinasa epidérmico humano (HER2 o ErbB2). EL gen de HER2 se sobreexpresa en un 25 % de los cánceres de mama invasivos, y está asociado con un mal pronóstico y sensibilidad alterada a agentes quimioterapéuticos. Herceptin bloquea la proliferación de cánceres de mama que sobreexpresan ErbB2, y actualmente es el único tratamiento de anticuerpo dirigido a ErbB2 aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer de mama metastásico (MBC) que sobreexpresa ErbB2. En células adultas normales, existen pocas moléculas ErbB2 en la superficie celular ~ 20 000 por célula, de modo que se forman pocos heterodímeros y las señales de crecimiento son relativamente débiles y controlables. Cuando se sobreexpresa ErbB2, ~ 500 000 por célula, se forman múltiples heterodímeros de ErbB2 y la señalización celular es más fuerte, provocando sensibilidad potenciada a factores de crecimiento y crecimiento maligno. Esto explica la causa de que la sobreexpresión de ErbB2 sea un indicador de mal pronóstico en tumores de mama y puede ser predictivo de respuesta al tratamiento.

ErbB2 es una diana prometedor y validada para cáncer de mama, donde se encuentra tanto en tumor primario como en sitios metastásicos. Herceptin induce una rápida eliminación de ErbB2 de la superficie celular, reduciendo de ese modo su capacidad de heterodimerizar y promover el crecimiento. Los mecanismos de acción de Herceptin observados en modelos *in vitro* e *in vivo* experimentales incluyen inhibición de la proteólisis del dominio extracelular de ErbB2, la alteración de las rutas de señalización posteriores tales como fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y las cascadas de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), detención del ciclo celular en G1, inhibición de la reparación de ADN, supresión de la angiogénesis e inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La mayoría de los pacientes con cáncer de mama metastásico que responden inicialmente a Herceptin, sin embargo, muestran progresión de la enfermedad en un año desde el inicio del tratamiento.

Otro receptor celular diana es el receptor del factor 1 de crecimiento de tipo insulina de tipo 1 (IGF-1R), IGF-1R es un receptor tirosina cinasa que desempeña una función crítica en la señalización de la supervivencia y la proliferación celular. El sistema de IGF está frecuentemente mal regulado en células cancerosas por el establecimiento de bucles autocrinos que implican IGF-I o -II y/o sobreexpresión de IGF-1R. Además, los estudios epidemiológicos han sugerido una vinculación entre niveles elevados de IGF y el desarrollo de cánceres humanos principales, tales como cáncer de mama, de colon, de pulmón y de próstata. La expresión de IGF y sus receptores afines se ha correlacionado con la fase de la enfermedad, supervivencia reducida, desarrollo de metástasis y desdiferenciación tumoral.

Además de IGF-1R, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) también se ha implicado en la tumorigénesis de numerosos cánceres. Se ha conseguido inhibición tumoral eficaz tanto de forma experimental como de forma clínica con varias estrategias que antagonizan cualquier actividad receptora. A causa de la redundancia de las rutas de señalización del crecimiento en células tumorales, la inhibición de una función receptora (por ejemplo, EGFR) podría compensarse de forma eficaz por la regulación por aumento de otras rutas mediadas por receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, IGF-1R). Por ejemplo, un estudio reciente ha demostrado que líneas celulares de glioma maligno que expresan EGFR equivalente tenían sensibilidad significativamente diferente a inhibición de EGFR dependiendo de su capacidad de activar IGF-1R y sus rutas de señalización posteriores. Otros estudios también han demostrado que la sobreexpresión y/o la activación de IGF-1R en células tumorales podría contribuir a su resistencia a agentes quimioterapéuticos, radiación o tratamiento con anticuerpos tales como Herceptin. Y por consiguiente, la inhibición de la señalización de IGF-1R ha provocado una sensibilidad aumentada de las células tumorales a Herceptin.

EGFR es un receptor tirosina cinasa que se expresa en muchos tejidos normales, así como lesiones neoplásicas de la mayoría de los órganos. La sobreexpresión de EGFR o la expresión de formas mutantes de EGFR se ha observado en muchos tumores, particularmente tumores epiteliales, y está asociado con un mal pronóstico clínico. La inhibición de la señalización a través de este receptor induce un efecto antitumoral. Con la aprobación por la FDA de Cetuximab, también conocido como Erbitux (un anticuerpo quimérico murino/humano) en febrero de 2004, EGFR se convirtió en una diana de fármaco de anticuerpo aprobado para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. En marzo de 2006, Erbitux también recibió la aprobación por la FDA para el tratamiento de carcinoma escamocelular de la cabeza y cuello (SCCHN). Más recientemente, Vectibix, un anticuerpo completamente humano dirigido contra EGFR, se aprobó para cáncer colorrectal metastásico. Ningún fármaco es un agente autónomo en cáncer colorrectal - se aprobaron como adyuvantes a los regímenes colorrectales existentes. En cáncer colorrectal, se administra Erbitux en combinación con el fármaco irinotecano y Vectibix se administra después de la progresión de la enfermedad a la vez que, o después de regímenes de quimioterapia que contienen fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecano. Erbitux se ha aprobado como un único agente en SCCHN recidivante o metastásico únicamente cuando ha fracasado la quimioterapia previa basada en platino. Ensayos clínicos avanzados que usan estos fármacos para abordar carcinoma broncopulmonar no microcítico están en curso. La secuencia de Erbitux o el anticuerpo contra EGFR, es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Goldstein, et al., Clin. Cancer Res. 1:1311, 1995; patente de Estados Unidos n.º 6.217.866).

Un obstáculo en la utilización de un anticuerpo catalítico para la activación selectiva de profármacos en tratamiento del cáncer ha sido el abordaje sistémico de tumores. La presente invención describe una estrategia basada en la adaptación de péptidos de unión a diana, o dominios de reconocimiento modulares (MRD), que se fusionan a anticuerpos de longitud completa que abordan de forma eficaz células tumorales o moléculas solubles mientras retienen la capacidad de activación del profármaco del anticuerpo catalítico. Como los MRD se fusionan al anticuerpo para que no mitiguen significativamente la unión al sitio de unión tradicional del anticuerpo, la especificidad del anticuerpo permanece intacta después de la adición de MRD.

Como se indica en la figura 2, los MRD, indicados por triángulos, círculos o cuadrados, pueden adjuntarse en cualquiera de los extremos la cadena pesada o ligera de un anticuerpo típico. El primer esquema representa un peptidocuerpo simple con un péptido fusionado al extremo C de un Fc. Esta estrategia proporcionó la preparación de anticuerpos bi, tri, tetra y pentaespecíficos. La presentación de único MRD en cada extremo N y C de una IgG proporciona una presentación octavalente del MRD. Como una alternativa a la construcción de anticuerpos bi y multifuncionales a través de la combinación de dominios variables de anticuerpo, los péptidos de alta afinidad seleccionados de colecciones de presentación en fagos o derivados de ligandos naturales pueden ofrecer una estrategia altamente versátil y modular a la construcción de anticuerpos multifuncionales que retienen las ventajas tanto de unión como de semivida de los anticuerpos tradicionales. Los MRD también pueden ampliar la capacidad de unión de anticuerpos no catalíticos, proporcionando una estrategia eficaz para ampliar la funcionalidad de unión de los anticuerpos, particularmente con fines terapéuticos.

Sumario

La protección buscada para esta invención es como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un anticuerpo de longitud completa que comprende un dominio de reconocimiento modular (MRD). También se incluyen en la presente invención variantes y derivados de dichos anticuerpos que comprenden un MRD. Específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo de longitud completa aislado que comprende al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD), en el que el MRD es de 2 a 60 aminoácidos y la diana del MRD es angiopoyetina-2 (Ang-2), en el que la diana del sitio de combinación de anticuerpo es un antígeno tumoral, y en el que el MRD está unido de forma funcional al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo o el extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo y en el que el MRD comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

MGAQTNFMPMDMLEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:7),
MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:8),
MGAQTNFMPMDATETRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:9),

AQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWD

5 PWTCEHMLE (SEQ ID NO:10),

AQQEECEFAPWTCEHM (SEQ ID NO:21)

AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFAPWTCEH

10 MLE (SEQ ID NO:23),

AQQEECELAPWTCEHM (SEQ ID NO:24),

AQQEECELAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEH

MLE (SEQ ID NO:26),

15 AQQEECEFSPWTCEHM (SEQ ID NO:27),

AQQEECEFSPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHM

LE2xConFS (SEQ ID NO:29),

20 AQQEECELEPWTCEHM (SEQ ID NO:30),

AQQEECELEPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELEPWTCEHM

LE (SEQ ID NO:32),

AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEH

MLE (SEQ ID NO:33);

AQQEECEF

APWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE (SEQ ID

25 NO:34),

MGAQTNFMPMDNDELLNYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:11) y
PXDNDXLLNY (SEQ ID NO:12), en el que X se selecciona de uno de los 20 aminoácidos de origen natural.

30 En un aspecto, el anticuerpo y el MRD están unidos de forma funcional mediante un péptido conector. En un
aspecto, el péptido conector es de una longitud entre 2 y 20 péptidos, o entre 4 a 10 o de aproximadamente 4 a 15
péptidos de longitud. En un aspecto de la presente invención, el péptido conector comprende la secuencia GGGG
(SSEQ ID NO:1), la secuencia SSGGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO:2), o la secuencia SSGGGGSGGGGGSSRSS
(SSEQ ID NO:19). Otros conectores que contienen una secuencia central GGGG como se muestra en la SEQ ID NO:1
35 se incluyen en este documento, en el que el péptido conector es de aproximadamente 4-20 aminoácidos.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, el MRD se une de forma funcional al extremo C-terminal
de la cadena pesada del anticuerpo. En otro aspecto, el MRD se une de forma funcional al extremo N-terminal de la
cadena pesada del anticuerpo. En otro aspecto más, el MRD se une de forma funcional al extremo C-terminal de la
40 cadena ligera del anticuerpo. En otro aspecto, el MRD se une de forma funcional al extremo N-terminal de la cadena
ligera del anticuerpo. En otro aspecto, dos o más MRD se unen de forma funcional a cualquier extremo terminal del
anticuerpo. En otro aspecto, dos o más MRD se unen de forma funcional a dos o más extremos terminales del
anticuerpo.

45 En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es un antígeno celular. En una realización de la
presente divulgación, la diana del MRD es CD20.

En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es una integrina. En un aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a integrina es YCRGDCT (SEQ ID NO:3). En otro aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a integrina es PCRGDCL (SEQ ID NO:4). En otro aspecto más de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a integrina es TCRGDCY (SEQ ID NO:5). En otro aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a integrina es LCRGDCF (SEQ ID NO:6).

En una realización de la presente invención, la diana del MRD es una citocina angiogénica. En un aspecto, la secuencia peptídica del MRD dirigido a citocina angiogénica es MGAQTNFMPMDDEQLRQYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:7). En otro aspecto, la secuencia peptídica del MRD dirigido a citocina angiogénica es MGAQTNFMPMDNDELLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:8). En otro aspecto más, la secuencia peptídica del MRD dirigido a citocina angiogénica es MGAQTNFMPMDATETRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:9). En otro aspecto, la secuencia peptídica del MRD dirigido a citocina angiogénica es AQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:10). En otro aspecto, la secuencia peptídica del MRD dirigido a citocina angiogénica es MGAQTNFMPMDNDELLNYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:11). En otro aspecto, la secuencia peptídica del MRD dirigido a citocina angiogénica es PXDNDXLLNY (SEQ ID NO:12), en el que X es uno de los 20 aminoácidos de origen natural. En otra realización de la presente divulgación, el péptido MRD de dirección tiene la secuencia central MGAQTNFMPMDX_n (SEQ ID NO:56), en el que X es cualquier aminoácido y n es de aproximadamente 0 a 15.

En otra realización de la presente divulgación, el péptido MRD de dirección contiene una secuencia central seleccionada de:

X_nEFAPWTX_n en el que n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 22);

X_nELAPWTX_n en el que n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 25);

X_nEFSPWTX_n en el que n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 28);

X_nELEPWTX_n en el que n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 31); y

X_n AQQEECEX₁X₂PWTCEHMX_n en el que n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos y X, X₁ y X₂ son cualquier aminoácido (SEQ ID NO:57).

Los péptidos ejemplares que contienen dichos péptidos centrales incluyen, por ejemplo:

AQQEECEFAPWTCEHM (SEQ ID NO:21);

AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 23);

AQQEECELAPWTCEHM (SEQ ID NO: 24);

AQQEECELAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 26);

AQQEECEFSPWTCEHM (SEQ ID NO: 27);

AQQEECEFSPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE 2xConFS (SEQ ID NO: 29);

AQQEECELEPWTCEHM (SEQ ID NO: 30);

AQQEECELEPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELEPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 32);

AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 33);

AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE (SEQ ID NO:34); y

AQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID. NO.:10).

En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es ErbB2. En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es ErbB3. En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es el antígeno de superficie asociado a tumor, molécula de adhesión celular epitelial (Ep-CAM).

En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es VEGF. En un aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a VEGF es VEPNCDIHVMWEWECFERL (SEQ ID NO:13).

En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es un receptor del factor I del crecimiento de tipo insulina. En un aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina es SFYSCLESLVNGPAEKSRGQWDGCRKK (SEQ ID NO:14). Otros MRD dirigidos a IGF-1R ilustrativos incluyen, por ejemplo, un péptido con la fórmula NFYQCIX₁X₂LX₃X₄X₅PAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:58), en la que X₁ es E o D; X₂ es cualquier aminoácido; X₃ es cualquier aminoácido; X₄ es cualquier aminoácido y X₅ es cualquier aminoácido.

Los péptidos ilustrativos de la presente divulgación que contienen la fórmula incluyen:

- 10 NFYQCIEMLASHPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 35);
- NFYQCIEQLALRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:36);
- 15 NFYQCIDLLMAYPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:37);
- NFYQCIERLVTGPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:38);
- NFYQCIEYLAMKPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 39);
- 20 NFYQCIEALQSRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 40);
- NFYQCIEALSRSRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 41);
- NFYQCIEHLSGSPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 42);
- 25 NFYQCIESLAGGPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 43);
- NFYQCIEALVGVPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 44);
- 30 NFYQCIEMLSLPPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 45);
- NFYQCIEVFWGRPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 46);
- NFYQCIEQLSSGPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 47);
- 35 NFYQCIELLSARPAEKSRGQWAE CRAG (SEQ ID NO: 48); y
- NFYQCIEALARTPAEKSRGQWVECRAP (SEQ ID NO: 49).

40 En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es un antígeno tumoral.

En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En una realización de la presente invención, la diana del MRD es un factor angiogénico. En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es un receptor angiogénico.

45 En una realización de la presente divulgación, el MRD es un péptido de migración vascular. En un aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del péptido de migración vascular es ACDCRGDCFCG (SEQ ID NO:15).

50 En una realización de la presente divulgación, la diana del MRD es un factor de crecimiento nervioso. En una realización de la presente invención, el anticuerpo se une a un antígeno de superficie celular.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo se une a EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina o a antígeno de membrana específico de próstata. En un aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a EGFR es VDNKFNKELEKAYNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQA PK (SEQ ID NO: 16). En un aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a EGFR es VDNKFNKEMWIAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ APK (SEQ ID NO: 17). En un aspecto de la presente divulgación, la secuencia peptídica del MRD dirigido a ErbB2 es

60 VDNKFNKEMRNAYWEIALLPNLNNQKRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQA
PK (SEQ ID NO: 18).

En una realización de la presente divulgación, el anticuerpo se une a un factor angiogénico.

En una realización de la presente divulgación, el anticuerpo se une a un receptor angiogénico.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos del anticuerpo. En un aspecto de la presente invención, un vector comprende el polinucleótido. En otro aspecto más, el polinucleótido está unido de forma funcional con una secuencia reguladora que controla la expresión en el polinucleótido. En un aspecto, una célula hospedadora comprende el polinucleótido o la descendencia.

La presente invención también se refiere al anticuerpo de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar un anticuerpo que comprende un MRD. En un aspecto, la enfermedad es cáncer. En otro aspecto, se inhibe la angiogénesis indeseada. En otro aspecto más de la divulgación, se modula la angiogénesis. En otro aspecto más, se inhibe el crecimiento tumoral. En otra realización, se describe un método de tratamiento que comprende administrar un agente terapéutico adicional junto con un anticuerpo que comprende un MRD.

La presente invención también se refiere a un método de generación de un anticuerpo de longitud completa que comprende un MRD. En un aspecto, el MRD se obtiene una colección de presentación en fagos. En otro aspecto, el MRD se obtiene de ligandos naturales.

En una realización de la presente divulgación, el anticuerpo es quimérico o humanizado.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra la representación esquemática de diferentes diseños de BsAb de tipo IgG tetravalentes.

La FIG. 2A muestra un pepticuerpo típico como una fusión C-terminal con Fc.

La FIG. 2B muestra un anticuerpo con una fusión de MRD C-terminal con la cadena ligera del anticuerpo.

La FIG. 2C muestra un anticuerpo con una fusión de MRD N-terminal con la cadena ligera del anticuerpo.

La FIG. 2D muestra un anticuerpo con péptidos MRD únicos fusionados a cada extremo del anticuerpo.

La FIG. 3 representa los resultados de un ELISA en que se unieron integrina y Ang2 por un anticuerpo anti-integrina fusionado a un MRD dirigido a Ang-2.

La FIG. 4 representa los resultados de un ELISA en que se unieron integrina y Ang2 por un anticuerpo anti-integrina fusionado a un MRD dirigido a Ang-2.

La FIG. 5 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un anticuerpo anti-ErbB2 a un MRD que estaba dirigido a Ang2.

La FIG. 6 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a Ang2 a un anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

La FIG. 7 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 8 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

La FIG. 9 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 10 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a VEGF a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 11 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo catalítico.

La FIG. 12 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a Ang-2 a un anticuerpo catalítico.

La FIG. 13 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina y a Ang-2 a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 14 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina a un anticuerpo de unión a ErbB2.

La FIG. 15 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina, a Ang-2 o al receptor del factor I de crecimiento I de tipo insulina a un anticuerpo de unión a ErbB2 o al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos con un corto péptido conector.

La FIG. 16 representa los resultados de un ELISA en que se fusionó un MRD dirigido a integrina, Ang-2 o al receptor del factor de crecimiento I de tipo insulina a un anticuerpo de unión a ErbB2 o al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos con un largo péptido conector.

Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" usado en este documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina intactas e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados. Un anticuerpo intacto comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH₁, CH₂ y CH₃. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviado en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida por un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

Un "anticuerpo de doble especificidad" se usa en este documento para hacer referencia a una molécula de inmunoglobulina que contiene inmunoglobulinas de doble dominio variable, donde el dominio doble variable puede diseñarse a partir de dos anticuerpos monoclonales cualesquiera.

Un "sitio de combinación de anticuerpo" es aquella parte estructural de una molécula de anticuerpo compuesta de una región variable de cadena pesada y ligera y regiones hipervariables que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. El término "inmunorreaccionar" en sus diversas formas significa unión específica entre una molécula que contiene determinante antigénico y una molécula que contiene un sitio de combinación de anticuerpo tal como una molécula de anticuerpo completo o una parte de la misma.

El término "peptidocuerpo" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de un anticuerpo intacto completo.

La expresión "de origen natural" cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras y similares se refiere a aquellos que se encuentran en la naturaleza y no están modificados por el ser humano.

"Anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen únicamente una especie de sitio de combinación de anticuerpo que puede inmunorreaccionar con un epítipo particular. Un anticuerpo monoclonal, por tanto, presenta típicamente una única afinidad de unión por cualquier epítipo con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal, por lo tanto, puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmuno-específico para un epítipo diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico.

Un "dominio de reconocimiento modular" (MRD) o "péptido de unión a diana" es una molécula, tal como una proteína, glucoproteína y similares, que puede unirse de forma específica (no aleatoria) a una molécula diana. La secuencia de aminoácidos de un sitio MRD puede tolerar algún grado de variabilidad y aún retener un grado de capacidad de unión a la molécula diana. Además, cambios en la secuencia pueden provocar cambios en la especificidad de unión y en la constante de unión entre una molécula diana preseleccionada y el sitio de unión.

"Receptor de superficie celular" se refiere a moléculas y complejos de moléculas que pueden recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un receptor de superficie celular de la presente invención es un receptor de integrina activado, por ejemplo, un receptor de integrina $\alpha\beta 3$ activado en una célula metastásica.

El "sitio de unión diana" o "sitio diana" es cualquier secuencia de aminoácidos conocida, o aún por describir, que tiene la capacidad de unirse selectivamente a un agente preseleccionado. Los sitios diana de referencia ejemplares se obtienen de los ligandos de integrina dependientes de RGD, concretamente fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, factor de von Willebrand y similares, de receptores celulares tales como VEGF, ErbB2, péptido de migración

vascular o citocinas angiogénicas, de receptores de hormonas proteínicas tales como receptor del factor I del crecimiento de tipo insulina, receptor del factor de crecimiento epidérmico y similares, y de antígenos tumorales.

5 El término "proteína" se define como un polímero biológico que comprende unidades derivadas de aminoácidos ligados mediante enlaces peptídicos; una proteína puede estar compuesta de dos o más cadenas.

10 Un "polipéptido de fusión" es un polipéptido compuesto de al menos dos polipéptidos y opcionalmente una secuencia de unión para unir de forma funcional los dos polipéptidos en un polipéptido continuo. Los dos polipéptidos unidos en un polipéptido de fusión típicamente se obtienen de dos fuentes independientes y, por lo tanto, un polipéptido de fusión comprende dos polipéptidos unidos no encontrados normalmente unidos en la naturaleza.

El término "conector" se refiere a un péptido ubicado entre el anticuerpo y el MRD. Los conectores pueden tener de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos, habitualmente de 4 a 15 aminoácidos.

15 "Célula diana" se refiere a cualquier célula en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un animal) que puede abordarse por el anticuerpo que comprende un MRD de la invención. La célula diana puede ser una célula que expresa o sobreexpresa el sitio de unión diana, tal como receptor de integrina activado.

20 "Paciente", "sujeto", "animal" o "mamífero" se usan indistintamente y hacen referencia a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como animales experimentales tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles.

25 "Tratar" o "tratamiento" incluye la administración del anticuerpo que comprende un MRD de la presente invención para evitar o retardar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, alivio de los síntomas o detención o inhibición del desarrollo adicional de la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retardar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión terapéutica o alivio de los síntomas después de la manifestación de la enfermedad. El tratamiento puede ser con la composición de anticuerpo-MRD en solitario, o puede usarse en combinación con un agente terapéutico adicional.

35 Como se usa en este documento, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", o "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de las mismas, que se refieren a composiciones, vehículo, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales tienen capacidad de administración en o sobre un ser humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, molestias gástricas y similares.

40 "Modular", significa el ajuste o regulación de la amplitud, frecuencia, grado o actividad. En otro aspecto relacionado, dicha modulación puede estar modulada positivamente (por ejemplo, un aumento en la frecuencia, grado o actividad) o modulada negativamente (por ejemplo, una disminución en la frecuencia, grado o actividad).

45 "Cáncer," "tumor," o "neoplasia" se usan como términos sinónimos y se refieren a cualquiera de varias enfermedades que se caracterizan por proliferación incontrolada y anómala de células, la capacidad de las células afectadas de propagarse de forma local o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del organismo (metastatizar), así como cualquiera de varios rasgos estructurales y/o moleculares característicos. Una "célula cancerosa", "tumoral" o "maligna" se entiende como una célula que tiene propiedades estructurales específicas, que carece de diferenciación y que tiene capacidad de invasión y metástasis. Los ejemplos de cánceres son cáncer de mama, broncopulmonar, cerebral, óseo, hepático, renal, de colon, cabeza y cuello, de ovario, hematopoyético (por ejemplo, leucemia) y de próstata.

50 "Anticuerpo humanizado" o "anticuerpo quimérico" incluye anticuerpos en que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

55 La presente invención describe una estrategia basada en la adaptación de péptidos de unión a diana, o dominios de reconocimiento modulares (MRD) como fusiones a anticuerpos catalíticos o no catalíticos que proporcionan dirección eficaz a células tumorales o a moléculas solubles dejando al mismo tiempo la capacidad de activación de profármacos del anticuerpo catalítico intacta. Los MRD también pueden ampliar la capacidad de unión de anticuerpos no catalíticos proporcionando una estrategia eficaz para ampliar la funcionalidad de unión de los anticuerpos, particularmente con fines terapéuticos.

60 Un aspecto de la presente divulgación se refiere al desarrollo de un anticuerpo de longitud completa que comprende un dominio de reconocimiento modular (MRD). La interacción entre un ligando proteínico y su sitio de receptor diana a menudo tiene lugar en una superficie de contacto relativamente grande. Sin embargo, únicamente unos pocos restos clave en la superficie de contacto contribuyen a la mayor parte de la unión. Por tanto, moléculas de longitud peptídica (generalmente de 2 a 60 aminoácidos) pueden unirse a la proteína receptora de un ligando proteínico

65

grande dado. Se contempla que los MRD de la presente invención contienen una secuencia peptídica que se une a angiopoyetina-2 (Ang-2) y son de 2 a 60 aminoácidos.

La función de las integrinas tales como $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ como marcadores asociados a tumor se ha documentado bien. Un reciente estudio de 25 líneas celulares humanas permanentes establecidas a partir de ovario avanzado demostró que todas las líneas eran positivas para la expresión de $\alpha v\beta 5$ y muchas eran positivas para la expresión de $\alpha v\beta 3$. Los estudios también han demostrado que $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ se expresan de forma elevada en tejidos de tumor cervical humano maligno. Las integrinas también han demostrado efectos terapéuticos en modelos animales de sarcoma de Kaposi, melanoma y cáncer de mama.

Varios antagonistas de integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ están en desarrollo clínico. Estos incluyen péptidos RGD cíclicos y miméticos de RGD de molécula pequeña sintéticos. Dos antagonistas de integrina basados en anticuerpo están actualmente en ensayo clínico para el tratamiento del cáncer. El primero es Vitaxin, la forma humanizada del anticuerpo LM609 murino anti- $\alpha v\beta 3$ humana. Un estudio en fase I de aumento de dosis en pacientes con cáncer demostró que era seguro para su uso en seres humanos. Otro anticuerpo en ensayo clínico es CNT095, un mAb completamente humano que reconoce integrinas αv . Un estudio en fase I de CNT095 en pacientes con una diversidad de tumores sólidos ha demostrado que se tolera bien. Cilengitide, un antagonista peptídico de $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, también ha demostrado ser seguro en ensayos en fase I. Además, ha habido numerosos estudios de dirección de fármacos y de imágenes basados en el uso de ligandos para estos receptores. Estas observaciones preclínicas y clínicas demuestran la importancia de abordar $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ y estudios que implican el uso de anticuerpos en esta estrategia han informado de forma coherente de que la dirección a través de estas integrinas es segura.

Un ejemplo de un MRD de unión a integrina es un sitio de unión que contiene tripéptido RGD, y es ejemplar de los métodos generales descritos en este documento. Los ligandos que tienen el motivo RGD como dominio de reconocimiento mínimo son bien conocidos, una lista parcial de los cuales incluye, con la diana de integrina correspondiente en paréntesis, fibronectina ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 3\beta 1$) fibrinógeno ($\alpha M\beta 2$ y $\alpha 11\beta 1$) factor de von Willebrand ($\alpha 11\beta 3$ y $\alpha v\beta 3$) y vitronectina ($\alpha 11\beta 3$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$).

Los ejemplos de MRD de dirección que contienen RGD útiles en la presente divulgación tienen secuencias de restos aminoacídicos mostradas a continuación:

YCRGDCT (SEQ ID. NO.:3)

PCRGDCL (SEQ ID. NO.:4)

TCRGDCY (SEQ ID. NO.:5)

LCRGDCF (SEQ ID. NO.:6)

Un MRD que imita un sitio de unión no dependiente de RGD en un receptor de integrina y que tiene la especificidad de unión a diana de un ligando de alta afinidad que reconoce la integrina seleccionada también se contempla en la presente divulgación.

La angiogénesis es esencial para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Ang2 ha demostrado actuar como molécula proangiogénica. La administración de inhibidores selectivos de Ang2 es suficiente para suprimir tanto la angiogénesis tumoral como la angiogénesis de la córnea. Por lo tanto, la inhibición de Ang2 en solitario o en combinación con la inhibición de otros factores angiogénicos tales como VEGF puede representar una estrategia antiangiogénica eficaz para tratar a pacientes con tumores sólidos.

También se describen MRD que se unen a receptores angiogénicos, factores angiogénicos y/o Ang-2. Los ejemplos de secuencias de MRD dirigidas a citocina angiogénica de la presente divulgación se enumeran a continuación:

MGAQTNFMPMDLLEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID. NO.:7)

MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLE (SEQ ID. NO.:8)

MGAQTNFMPMDATETRLYEQFILQQGLE (SEQ ID. NO.:9)

AQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID. NO.:10)
(2xCon4)

MGAQTNFMPMDNDELLNYEQFILQQGLE (SEQ ID. NO.:11)

PXDNDXLLNY (SEQ ID. NO.:12) donde X es uno de los 20 aminoácidos de origen natural

MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLEGGSGSTASSGSGSSLGAQTNFMPMDNDE
 LLLY (SEQ ID NO: 20)

AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID. NO.:10)

5 AQEECEFAPWTCEHM ConFA (SEQ ID NO:21)

núcleo nEFAPWTn (SEQ ID NO: 22) donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos

10 AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 23) 2xConFA

AQEECELAPWTCEHM (SEQ ID NO: 24) ConLA

XnELAPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos y X es cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 25)

15 AQEECELAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 26) 2xConLA

AQEECEFSPWTCEHM ConFS (SEQ ID NO: 27)

20 XnEFSPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos y X es cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 28)

AQEECEFSPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE 2xConFS (SEQ ID NO: 29)

25 AQEECELEPWTCEHM ConLE (SEQ ID NO: 30)

XnELEPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 31) y en la que X es cualquier aminoácido

30 AQEECELEPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELEPWTCEHMLE 2xConLE (SEQ ID NO: 32)

Debe entenderse que dichos péptidos pueden estar presentes en dímeros, trímeros u otros multímeros de naturaleza homóloga o heteróloga. Por ejemplo, se pueden dimerizar secuencias basadas en Con idénticas tales como en 2xConFA para proporcionar un dímero homólogo, o los péptidos Con pueden mezclarse de modo que ConFA se combine ConLA para crear el heterodímero ConFA-LA con la secuencia: AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 33).

35 ConFA se combine ConLA para crear el heterodímero ConFA-LA con la secuencia: AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 33).

Otro heterodímero es ConFA combinado con ConFS para crear ConFA-FS con la secuencia: AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE (SEQ ID NO:34).

40 Un experto en la materia, dados los contenidos de este documento, apreciará que dichas otras combinaciones crearán MRD de unión a Ang2 funcionales como se describe en este documento.

45 En un aspecto, la presente divulgación incluye un péptido que tiene la secuencia: NFYQCIX₁X₂LX₃X₄X₅PAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:58), en la que X₁ es E o D; X₂ es cualquier aminoácido; X₃ es cualquier aminoácido; X₄ es cualquier aminoácido y X₅ es cualquier aminoácido.

La presente divulgación también incluye péptidos que tienen una secuencia central seleccionada de:

50 XnEFAPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 22);
 XnELAPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 25);
 XnEFSPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 28);
 XnELEPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 31); o
 55 Xn AQEECEX₁X₂PWTCEHMXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos y X, X₁ y X₂ son cualquier aminoácido (SEQ ID NO:57).

60 Se ha informado de selecciones de presentación en fagos y estudios estructurales de péptidos neutralizantes de VEGF en complejo con VEGF. Estos estudios han revelado que el péptido v114 (VEPNCDIHVMWEWECFERL) (SEQ ID NO:13) es específico de VEGF, se une a VEGF con afinidad 0,2 μM y neutraliza la proliferación inducida por VEGF de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Como VEGF es un homodímero, el péptido ocupa dos sitios idénticos en cualquier extremo del homodímero de VEGF. Un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a VEGF se contempla en la presente divulgación. Los anticuerpos anti-VEGF pueden encontrarse, por ejemplo, en Cancer Research 57, 4593-4599, Oct. 1997; J Biol Chem 281:10 6625, 2006.

Pueden usarse MRD específicos del receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina en la presente divulgación. Un ejemplo de una secuencia MRD dirigida al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina es SFYSCLESLVNGPAEKSRGQWDGCRKK (SEQ ID NO:14).

5 MRD de IGF-1R adicionales de la presente divulgación incluyen las siguientes:

NFYQCIEMLASHPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 35)

NFYQCIEQLALRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:36)

10 NFYQCIDLLMAYPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:37)

NFYQCIERLVTGPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:38)

15 NFYQCIEYLAMKPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 39)

NFYQCIEALQSRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 40)

20 NFYQCIEALSRSPA EKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 41)

NFYQCIEHLSGSPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 42)

NFYQCIESLAGGPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 43)

25 NFYQCIEALVGVPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 44)

NFYQCIEMLSLPPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 45)

30 NFYQCIEVFWGRPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 46)

NFYQCIEQLSSGPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 47)

NFYQCIELLSARPA EKSRGQWAECRAG (SEQ ID NO: 48)

35 NFYQCIEALARTPA EKSRGQWVECRAP (SEQ ID NO: 49)

40 Varios estudios han caracterizado la eficacia de unir el péptido de migración vascular a otras proteínas como IL-12 o fármacos para dirigir su suministro a animales vivos. Por tanto, los MRD de migración vascular se contemplan para su uso en la presente divulgación. Un ejemplo de una secuencia MRD que es un péptido de migración vascular es ACDCRGDCFCG (SEQ ID NO:15).

45 Se contemplan otros numerosos sitios de unión diana por la presente divulgación, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), CD20, antígenos tumorales, ErbB2, ErbB3, ErbB4, el receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina, el factor de crecimiento nervioso (NGR), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos y el antígeno de superficie asociado a tumor, molécula de adhesión celular epitelial (Ep-CAM). Los MRD pueden estar dirigidos a estos sitios de unión diana.

Los ejemplos de secuencias MRD de la presente divulgación que se unen a EGFR se enumeran a continuación:

VDNKFNKELEKAYNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQA

50 PK (SEQ ID. NO.: 16).

VDNKFNKEMWIAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ

APK (SEQ ID. NO.: 17).

Un ejemplo de una secuencia MRD de la presente divulgación que se une a ErbB2 se enumera a continuación:

55 VDNKFNKEMRNAYWEIALLPNLNNQKRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQA

PK (SEQ ID. NO.: 18).

La secuencia del MRD puede determinarse de varias maneras. Las secuencias MRD pueden obtenerse de ligandos naturales o pueden usarse secuencias conocidas que se unen a un sitio de unión diana específico. Adicionalmente, la tecnología de presentación en fagos ha surgido como un método potente en la identificación de péptidos que se unen a receptores diana. En colecciones de presentación en fagos de péptidos, pueden presentarse secuencias peptídicas aleatorias por fusión con proteínas de la cubierta de fagos filamentosos. Los procedimientos para averiguar los sitios de unión en polipéptidos usando vectores de presentación en fagos se ha descrito previamente, en particular en el documento WO 94/18221. Los métodos en general implican el uso de un sistema de expresión superficial de fago filamentosos (fagómido) para la clonación y la expresión de polipéptidos que se unen al sitio diana preseleccionado de interés.

Los métodos de la presente invención para preparar MRD implican el uso de vectores de presentación en fagos por su ventaja particular de proporcionar un medio para cribar una población muy grande de proteínas de presentación expresadas y de ese modo ubicar uno o más clones específicos que codifican una reactividad de unión a diana deseada. Una vez se ha averiguado la secuencia del MRD, los péptidos pueden prepararse por cualquiera de los métodos divulgados en la técnica.

Se incluyen variantes y derivados de los MRD dentro del alcance de la presente invención. Se incluyen dentro de las variantes, variantes de inserción, de eliminación y de sustitución, así como variantes que incluyen MRD presentados en esta ocasión con aminoácidos adicionales en el extremo N y/o C, incluyendo de aproximadamente 0 a 50, 0 a 40, 0 a 30, 0 a 20 aminoácidos y similares. Se entiende que MRD de la presente invención puede contener uno, dos o los tres tipos de variantes. Las variantes de inserción o de sustitución pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no convencionales o ambos.

Se contempla que pueden usarse anticuerpos catalíticos y no catalíticos en la presente invención. El anticuerpo 38C2 es un hibridoma de secreción de anticuerpo, y se ha descrito previamente en el documento WO 97/21803. 38C2 contiene un sitio de combinación de anticuerpo que cataliza la reacción de adición de aldol entre un donador alifático y un aceptador de aldehído. En un modelo de ratón singénico de neuroblastoma, la administración sistémica de un profármaco de etopósido y la inyección intratumoral de Ab 38C2 inhibía el crecimiento tumoral.

Otros anticuerpos de interés para esta invención incluyen anticuerpos de unión a A33. El antígeno A33 humano es una glucoproteína transmembranaria de la superfamilia de Ig. La función del antígeno A33 humano en tejido de colon normal y maligno aún no es conocida, sin embargo, varias propiedades del antígeno A33 sugieren que es una diana prometedor para inmunoterapia de cáncer de colon. Estas propiedades incluyen (i) el patrón de expresión altamente restringido del antígeno A33, (ii) la expresión de grandes cantidades del antígeno A33 en células de cáncer de colon, (iii) la ausencia de antígeno A33 secretado o desprendido y (iv) el hecho de que tras la unión del anticuerpo A33 al antígeno A33, el anticuerpo A33 se internaliza y se secuestra en vesículas y (v) la dirección del anticuerpo A33 a cáncer de colon que expresa el antígeno A33 en estudios clínicos preliminares. La fusión de un MRD dirigido a A33 a un anticuerpo catalítico o no catalítico aumentaría la eficacia terapéutica de anticuerpos dirigidos a A33.

La presente invención también contempla la preparación de anticuerpos mono, bi, tri, tetra y pentaespecíficos. Se contempla que los anticuerpos usados en la presente invención puedan prepararse por cualquier método conocido en la técnica.

En las moléculas de fusión de anticuerpo-MRD preparadas con la presente invención, el MRD puede adherirse a un anticuerpo mediante el extremo N o el extremo C del péptido. El MRD puede adherirse al anticuerpo en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo o el extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo. El MRD puede adherirse al anticuerpo directamente o adherirse mediante un péptido conector opcional, que puede tener entre 2 y 20 péptidos de longitud. EL péptido conector puede contener un corto péptido conector con la secuencia GGGG (SEQ ID NO:1), un péptido conector mediano con una secuencia SSGGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO:2), o un péptido conector largo con la secuencia SSGGGGSGGGGGSSRSS (SEQ ID NO:19). La presente invención también proporciona dos o más MRD que se unen a cualquier extremo terminal del anticuerpo. También se contempla que dos o más MRD pueden adherirse directamente o adherirse mediante un péptido conector a dos o más extremos terminales del anticuerpo. Los múltiples MRD pueden abordar el mismo sitio de unión diana. Pueden añadirse secuencias peptídicas adicionales para potenciar la estabilidad *in vivo* del MRD.

Las moléculas de fusión de anticuerpo-MRD pueden estar codificadas por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos. Un vector puede contener la secuencia polinucleotídica. La secuencia polinucleotídica también puede unirse con una secuencia reguladora que controla la expresión del polinucleótido en una célula hospedadora. Una célula hospedadora, o su descendencia, puede contener el polinucleótido que codifica la molécula de fusión de anticuerpo-MRD.

La presente invención contempla composiciones terapéuticas útiles para poner en práctica los métodos terapéuticos descritos en este documento. Las composiciones terapéuticas de la presente invención contienen un vehículo fisiológicamente tolerable junto con al menos una especie de anticuerpo que comprende un MRD como se describe

en este documento, disuelto o dispersado en el mismo como ingrediente activo. En una realización preferida, la composición terapéutica no es inmunógena cuando se administra a un paciente humano con fines terapéuticos.

5 La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma está bien comprendida en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables estériles en forma de soluciones líquidas o suspensiones, acuosas o no acuosas, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones, en líquido antes de su uso. La preparación también puede emulsionarse. Por tanto, una composición que contiene anticuerpo - MRD puede adoptar la forma de 10 soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, u otras formas de composición.

15 El ingrediente activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, que potencian la eficacia del ingrediente activo.

20 La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, 25 trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

30 Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, como solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Además, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tamponante, así como sales tales como cloruro de sodio y de potasio, dextrosa, propilenglicol, polietilenglicol y otros solutos.

35 Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y excluyendo el agua.

Ejemplos de dichas fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, ésteres orgánicos tales como oleato de etilo y emulsiones de agua en aceite.

40 Una composición terapéutica contiene un anticuerpo que comprende un MRD de la presente invención, típicamente en una cantidad de al menos un 0,1 por ciento en peso de anticuerpo por peso de composición terapéutica total. Un porcentaje ponderal es una proporción en peso de anticuerpo a la composición total. Por tanto, por ejemplo, un 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de anticuerpo-MRD por 100 gramos de composición total.

45 Una composición terapéutica que contiene anticuerpo típicamente contiene aproximadamente de 10 microgramos (ug) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por ml de anticuerpo como ingrediente activo por volumen de composición, y más preferiblemente contiene aproximadamente de 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (es decir, de aproximadamente un 0,1 a un 1 por ciento en peso).

50 Una composición terapéutica en otra realización contiene un polipéptido de la presente invención, típicamente en una cantidad de al menos un 0,1 por ciento en peso de polipéptido por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje ponderal es una proporción en peso de polipéptido a la composición total. Por tanto, por ejemplo, un 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de polipéptido por 100 gramos de composición total.

55 Preferiblemente, una composición terapéutica que contiene polipéptido típicamente contiene aproximadamente de 10 microgramos (ug) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por ml de polipéptido como ingrediente activo por volumen de composición, y más preferiblemente contiene aproximadamente de 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml (es decir, de aproximadamente un 0,1 a un 1 por ciento en peso).

60 En vista del beneficio de usar anticuerpos humanizados o quiméricos *in vivo* en pacientes humanos, las moléculas de anticuerpo-MRD actualmente descritas son particularmente muy adecuadas para su uso *in vivo* como reactivo terapéutico. El método de la presente divulgación comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que contiene un anticuerpo que comprende un MRD de la invención.

65 Los intervalos de dosificación para la administración del anticuerpo que comprende un MRD de la invención son aquellos suficientemente grandes para producir el efecto deseado en que se mejoran los síntomas de la enfermedad

mediados por la molécula diana. La dosificación no debe ser tan grande que cause efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardiaca congestiva y similares. En general, la dosificación variará con la edad, estado, género y grado de la enfermedad del paciente y puede determinarse por un experto en la materia. La dosificación puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que comprende un MRD de esta invención es típicamente una cantidad de anticuerpo que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para conseguir una concentración en plasma de aproximadamente 0,1 microgramos (ug) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 ug/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 ug/ml a aproximadamente 5 ug/ml, y habitualmente de aproximadamente 5 ug/ml. Indicado de forma diferente, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, mucho más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis al día, durante uno o varios días.

El anticuerpo que comprende MRD de la invención puede administrarse por vía parenteral por inyección o por infusión gradual en el tiempo. Aunque la molécula diana puede acceder al organismo por administración sistémica y, por lo tanto, muy a menudo se trata por administración intravenosa de composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de suministro donde existe una probabilidad de que el tejido diana contenga la molécula diana. Por tanto, los anticuerpos que comprenden un MRD de la invención pueden administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad, transdérmica y pueden suministrarse por medios peristálticos.

Las composiciones terapéuticas que contiene un anticuerpo monoclonal humano o un polipéptido de esta invención se administran convencionalmente por vía intravenosa, como por inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido; es decir, excipiente o vehículo.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrarse depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto de utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para administrarse dependen del criterio del facultativo y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para aplicación sistémica se divulgan en este documento y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para administración también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida por dosis repetidas a intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. Como alternativa, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para tratamientos *in vivo*.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo de longitud completa aislado que comprende un dominio de reconocimiento modular (MRD). EL anticuerpo y el MRD pueden unirse de forma funcional mediante un péptido conector.

El péptido conector puede tener entre 2 y 20 péptidos o entre 4 y 15 péptidos.

El péptido conector puede comprender la secuencia GGGS (SEQ ID NO:1), la secuencia SSGGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO:2) o la secuencia SSGGGGSGGGGGSSRSS (SEQ ID NO:19).

El MRD está unido de forma funcional al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, al extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, al extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo, al extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo, al cualquier extremo terminal del anticuerpo o a dos o más extremos terminales del anticuerpo.

La diana del MRD de la presente divulgación puede ser una integrina.

El MRD dirigido a integrina de la presente divulgación puede comprender la secuencia YCRGDCT (SEQ ID NO:3), la secuencia PCRGDCL (SEQ ID NO:4), la secuencia TCRGDCY (SEQ ID NO:5), o la secuencia LCRGDCE (SEQ ID NO:6).

La diana del MRD puede ser una citocina angiogénica.

El MRD dirigido a citocina angiogénica puede comprender la secuencia MGAQTNFMPMDLLEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:7), la secuencia MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:8), o la secuencia MGAQTNFMPMDATETRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:9).

El MRD dirigido a citocina angiogénica puede seleccionarse del grupo que consiste en:

- 5 AQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID. NO.:10)
- AQQEECEFAPWTCEHM (SEQ ID NO:21)
- AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 23)
- AQQEECELAPWTCEHM (SEQ ID NO: 24)
- AQQEECELAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 26)
- AQQEECEFSPWTCEHM (SEQ ID NO: 27)
- 10 AQQEECEFSPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE 2xConFS (SEQ ID NO: 29)
- AQQEECELEPWTCEHM (SEQ ID NO: 30)
- AQQEECELEPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELEPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 32)
- AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 33) y
- AQQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE (SEQ ID NO:34).

15 El MRD dirigido a citocina angiogénica puede comprender la secuencia MGAQTNFMPMDDLEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:11).

El MRD dirigido a citocina angiogénica puede comprender la secuencia PXDNDXLLNY (SEQ ID NO:12), donde X se selecciona de uno de los 20 aminoácidos de origen natural.

20 La diana del MRD de la presente divulgación puede ser ErbB2.

La diana del MRD de la presente divulgación puede ser VEGF. El MRD dirigido a VEGF puede comprender la secuencia VEPNCDIHVMWEWECFERL (SEQ ID NO:13).

25 La diana del MRD de la presente divulgación puede ser un receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina.

El MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina de la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en:

- 30 SFYSCLESLVNGPAEKSRGQWDGCRKK (SEQ ID. NO.:14)
- NFYQCIEMLASHPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 35)
- NFYQCIEQLALRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:36)
- 35 NFYQCIDLLMAYPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:37)
- NFYQCIERLVTGPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:38)
- NFYQCIEYLAMKPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 39)
- NFYQCIEALQSRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 40)
- NFYQCIEALSRSPA EKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 41)
- 40 NFYQCIEHLSGSPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 42)
- NFYQCIESLAGGPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 43)
- NFYQCIEALVGVPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 44)
- NFYQCIEMLSLPPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 45)
- NFYQCIEVFWGRPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 46)
- NFYQCIEQLSSGPAEKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 47)
- 45 NFYQCIELLSARPAEKSRGQWAECRAG (SEQ ID NO: 48) y
- NFYQCIEALARTPAEKSRGQWVECRAP (SEQ ID NO: 49).

La diana del MRD puede ser un antígeno tumoral.

50 La diana del MRD de la presente divulgación puede ser CD20.

La diana del MRD de la presente divulgación puede ser un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

55 El MRD dirigido a EGFR de la presente divulgación puede comprender la secuencia VDNKFNKELEKAYNEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQA PK (SEQ ID NO:16) o la secuencia

VDNKFNKEMWIAWEEIRNLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ
APK (SEQ ID. NO.: 17).

60 La diana del MRD de la presente divulgación puede ser el receptor ErbB2, en el que el MRD dirigido al receptor ErbB2 comprende la secuencia

VDNKFNKEMRNAYWEIALLPNLNNQKRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQA
PK (SEQ ID. NO.: 18).

La diana del MRD de la presente divulgación puede ser el receptor ErbB3.

- 5 La diana del MRD de la presente divulgación puede ser el antígeno de superficie asociado a tumor, molécula de adhesión celular epitelial (Ep-CAM).

La diana del MRD puede ser un factor angiogénico.

- 10 El anticuerpo puede unirse a un antígeno de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina o el antígeno de membrana específico de próstata.

La diana del MRD de la presente divulgación puede ser un receptor angiogénico.

- 15 El anticuerpo puede unirse a un antígeno de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina o el antígeno de membrana específico de próstata.

- 20 El anticuerpo puede unirse a un factor angiogénico o a un receptor angiogénico.

La diana del MRD puede ser un antígeno de superficie celular.

- 25 El anticuerpo puede unirse a un antígeno de superficie celular, en el que el antígeno de superficie celular se selecciona del grupo que consiste en EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina o el antígeno de membrana específico de próstata.

El anticuerpo puede unirse a un factor angiogénico.

- 30 El anticuerpo puede unirse a un receptor angiogénico.

El MRD de la presente divulgación puede ser un péptido de migración vascular. El MRD dirigido al péptido de migración vascular puede comprender la secuencia ACDCRGDCFCG (SEQ ID NO.:15).

- 35 El MRD de la presente divulgación puede ser un factor de crecimiento nervioso (NGF),

Una realización de la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de longitud completa aislado según se reivindica que comprende un MRD.

- 40 Una realización adicional proporciona un vector que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de longitud completa aislado según se reivindica que comprende un MRD. La secuencia de nucleótidos del polinucleótido puede estar unida de forma funcional a una secuencia reguladora que controla la expresión del polinucleótido en una célula hospedadora.

- 45 Otra realización proporciona una célula hospedadora que comprende el vector, o la descendencia de la célula.

También se describe un método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un anticuerpo de longitud completa aislado que comprende un MRD. La enfermedad puede ser cáncer. Un agente terapéutico adicional puede administrarse al sujeto.

- 50 También se describe un método de inhibición de la angiogénesis, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un anticuerpo de longitud completa aislado que comprende un MRD. Un agente terapéutico adicional puede administrarse al sujeto.

- 55 También se describe un método de modulación de la angiogénesis, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un anticuerpo de longitud completa aislado que comprende un MRD. Un agente terapéutico adicional puede administrarse al sujeto.

- 60 También se describe un método de inhibición del crecimiento tumoral, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un anticuerpo de longitud completa aislado que comprende un MRD. Un agente terapéutico adicional puede administrarse al sujeto.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir un anticuerpo de longitud completa que comprende uno o más MRD, comprendiendo dicho método seleccionar un MRD usando una diana de unión a MRD, en el que el MRD se obtiene de una colección de presentación en fagos.

5 En una realización, la presente divulgación proporciona un método para producir un anticuerpo de longitud completa que comprende uno o más MRD, comprendiendo dicho método seleccionar un MRD usando una diana de unión a MRD, en el que el MRD se obtiene de ligandos naturales.

10 La presente invención también proporciona un anticuerpo de longitud completa aislado según se reivindica, que comprende un MRD en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

15 En otra realización, la presente divulgación proporciona un péptido que comprende la secuencia NFYQCIX₁X₂LX₃X₄X₅PAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:58), en la que X₁ es E o D; X₂ es cualquier aminoácido; X₃ es cualquier aminoácido; X₄ es cualquier aminoácido y X₅ es cualquier aminoácido.

El péptido de la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en:

- 20 NFYQCIEMLASHPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 35)
- NFYQCIEQLALRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:36)
- NFYQCIDLLMAYPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:37)
- NFYQCIERLVTGPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO:38)
- NFYQCIEYLAMKPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 39)
- NFYQCIEALQSRPAEKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 40)
- NFYQCIEALSRSPA EKSRGQWQECRTGG (SEQ ID NO: 41)
- 25 NFYQCIEHLSGSPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 42)
- NFYQCIESLAGGPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 43)
- NFYQCIEALVGVPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 44)
- NFYQCIEMLSLPPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 45)
- NFYQCIEVFWGRPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 46) y
- 30 NFYQCIEQLSSGPA EKSRGQWQECRTG (SEQ ID NO: 47).

En una realización, la presente divulgación proporciona un péptido seleccionado de

MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLEGGSGSTASSGSGSSLGAQTNFMPMDN
DELLLY (SEQ ID NO: 20)

35 NFYQCIELLSARPAEKSRGQWAE CRAG (SEQ ID NO: 48) o
NFYQCIEALARTPAEKSRGQWVECRAP (SEQ ID NO: 49).

En una realización, la presente divulgación proporciona un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

40 X_nEFAPWTX_n donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoácidos (SEQ ID NO: 22);
X_nELAPWTX_n donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoácidos (SEQ ID NO: 25);
X_nEFPWTX_n donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoácidos (SEQ ID NO: 28);
45 X_nELEPWTX_n donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoácidos (SEQ ID NO: 31); y
X_nAQEECEX₁X₂PWTCEHM_n donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoácidos y
X, X₁ y X₂ son cualquier aminoácido (SEQ ID NO:57). El péptido puede seleccionarse del grupo que consiste en:

- 50 AQEECEFPWTCEHM (SEQ ID NO:21)
- AQEECEFPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 23)
- AQEECELPWTCEHM (SEQ ID NO: 24)
- AQEECELPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 26)
- AQEECEFPWTCEHM (SEQ ID NO: 27)
- AQEECEFPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFPWTCEHMLE 2xConFS (SEQ ID NO: 29)
- 55 AQEECELEPWTCEHM (SEQ ID NO: 30)
- AQEECELEPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELEPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 32)
- AQEECEFPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 33)
- 60 AQEECEFPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFPWTCEHMLE (SEQ ID NO:34); y
- AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID. NO.:10).

Los siguientes ejemplos pretender ilustrar, pero no limitar, la invención.

EjemplosEjemplo 1. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina

5 Se prepararon moléculas de fusión de anticuerpo-MRD novedosas por fusión de un péptido dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ a un anticuerpo catalítico 38C2. Las fusiones en los extremos N y los extremos C de la cadena ligera y los extremos C de la cadena pesada fueron las más eficaces. Usando citometría de flujo, los conjugados de anticuerpo demostraron unirse de forma eficaz a células de cáncer de mama humano que expresa integrina $\alpha\beta 3$. Los conjugados de anticuerpo también retenían la actividad *retro*-aldol de su anticuerpo catalítico precursor 38C2, medida por activación de profármaco metodal y doxorubicina. Esto demuestra que la capacidad de dirección celular y de anticuerpo catalítico pueden combinarse de forma eficaz para quimioterapia selectiva.

Ejemplo 2. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a citocina angiogénica

15 Se construyeron moléculas de fusión de anticuerpo - MRD dirigidas a citocina angiogénica. El anticuerpo usado fue 38C2, que se fusionó con un MRD que contiene el péptido 2xCon4 (AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:10)). El péptido MRD se fusionó al extremo N o C de la cadena ligera y el extremo C de la cadena pesada. Se encontraron resultados similares con los otros péptidos MRD de Ang-2. Los péptidos MRD de Ang-2 MRD adicionales incluyen:

20 LM-2x-32

MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLEGGSGSTASSGSGSSLGAQTNFMPMDNDE

LLLY (SEQ ID NO:20)

25 AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (2xCon4) (SEQ ID NO:10)

AQEECEFAPWTCEHM ConFA (SEQ ID NO:21)

30 núcleo XnEFAPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO:22)

AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFAPWTCEHMLE 2xConFA (SEQ ID NO:23)

AQEECELAPWTCEHM ConLA (SEQ ID NO:24)

35 XnELAPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO:25)

AQEECELAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE 2xConLA (SEQ ID NO:26)

40 AQEECEFSPWTCEHM ConFS (SEQ ID NO:27)

XnEFSPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO:28)

AQEECEFSPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE 2xConFS (SEQ ID NO:29)

45 AQEECELEPWTCEHM ConLE (SEQ ID NO:30)

XnELEPWTXn donde n es de aproximadamente de 0 a 50 restos aminoacídicos (SEQ ID NO: 31);

50 AQEECELEPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELEPWTCEHMLE 2xConLE (SEQ ID NO:32).

55 Debe entenderse que dichos péptidos pueden estar presentes en dímeros, trímeros u otros multímeros de naturaleza homóloga o heteróloga. Por ejemplo, se pueden dimerizar secuencias basadas en Con idénticas tales como en 2xConFA para proporcionar un dímero homólogo, o los péptidos Con pueden mezclarse de modo que ConFA se combine ConLA para crear el heterodímero ConFA-LA con la secuencia: AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCEHMLE (SEQ ID NO:33).

Otro heterodímero ilustrativo es ConFA combinado con ConFS para crear ConFA-FS con la secuencia: AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE (SEQ ID NO:34).

60 Un experto en la materia, dados los contenidos de este documento, apreciará que dichas otras combinaciones crearán MRD de unión a Ang2 funcionales como se describe en este documento.

Ejemplo 3. Fusiones de anticuerpo-MRD con anticuerpos no catalíticos

Se ha descrito previamente un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado, LM609, dirigido a integrina humana $\alpha\beta3$. (Rader, C. et. al., 1998. Rader C, Cheresh DA, Barbas CF 3.^o. Proc Natl Acad Sci U S A. 21 de julio de 1998; 95(15):8910-5).

Se fusionó un Ab monoclonal no catalítico humano, JC7U a un MRD anti-Ang2 MRD que contenía 2xCon4 (AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:10)) en el extremo N o C de la cadena ligera. 2xCon4 (AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:10)) se estudió como una fusión N-terminal a la cadena Kappa del anticuerpo (2xCon4-JC7U) y como una fusión C-terminal (JC7U-2xCon4). Ambas fusiones mantenían la unión a integrina y Ang2. Como se muestra en el panel de la izquierda de la figura 3, ambas construcciones de anticuerpo (2xCon4-JC7U y JC7U-2xCon4) se unían específicamente a Ang2 recombinante como se demostró por estudios de ELISA. La unión a Ang2, sin embargo, es significativamente mayor con JC7U-2xCon4, que tiene la fusión 2xCon4 (SEQ ID NO:10) en el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo. El panel de la derecha de la figura 3 representa la unión de Ang2-JC7U y JC7U-Ang2 a integrina $\alpha\beta3$. Los resultados muestran que la fusión de 2xCon4 (SEQ ID NO:10) al extremo N o C de la cadena ligera no afecta a la unión del mAb JC7U a la integrina $\alpha\beta3$. La figura 4 representa otro estudio de ELISA usando las mismas construcciones de fusión de anticuerpo-MRD.

Ejemplo 4. Moléculas de fusión de Herceptin - MRD

Otro ejemplo de fusiones de MRD a un anticuerpo no catalítico son construcciones de fusión de Herceptin - MRD. Las fusiones de Herceptin-MRD son antagonistas multifuncionales de integrina αv de molécula pequeña y el anticuerpo dirigido a integrina programado químicamente muestra eficacia notable en la prevención de metástasis de cáncer de mama por interferencia con la adhesión celular y proliferación mediada por αv . Las fusiones de MRD que contienen Herceptin-2xCon4 (dirigidas a ErbB2 y Ang-2) y Herceptin-V 114 (dirigidas a ErbB2 y VEGF) y Herceptin-RGD-4C-2xCon4 (dirigidas a ErbB2, ang2 e integrina) son eficaces.

Ejemplo 5. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a VEGF

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a VEGF. Se fusionó un MRD dirigido a v114 (SEQ ID NO 13) en el extremo N de la cadena kappa de 38C2 y Herceptin usando la secuencia conectora larga (SEQ ID NO 2). La expresión y ensayo de las construcciones de fusión resultantes de anticuerpo-MRD demostraron fuerte unión a VEGF.

Ejemplo 6. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a IGF-1R

Se estudió la fusión de un MRD dirigido a IGF-1R (SFYSCLESLVNGPAEKSRGQWDGCRKK (SEQ ID NO:14)) al extremo N de la cadena kappa de 38C2 y Herceptin usando la secuencia conectora larga como conector. La expresión y ensayo de las construcciones de fusión resultantes de anticuerpo-MRD demostraron fuerte unión a IGF-1R. También se identificaron clones adicionales que muestran alta unión a IGF-1R después de varias rondas de mutagénesis y cribado. Las secuencias preferidas enumeradas a continuación no muestran afinidad de unión significativa o no muestran afinidad de unión al receptor de insulina. (Véase la Tabla 2).

Tabla 1: Molde para mutagénesis adicional:

Rm2-2-218	GTGGAGTGCAGGGCGCCG	VECRAP	SEQ ID NO: 50, 51
Rm2-2-316	GCTGAGTGCAGGGCTGGG	AECRAG	SEQ ID NO: 52, 53
Rm2-2-319	CAGGAGTGCAGGACGGGG	QECRTG	SEQ ID NO: 54, 55

Tabla 2:

Mutante	Secuencia de aminoácidos	Molde	SEQ ID NO:
Rm4-31	NFYQCIEMLASHPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	35
Rm4-33	NFYQCIEQLALRPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	36
Rm4-39	NFYQCIDLLMAYPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	37
Rm4-310	NFYQCIERLVTGPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	38
Rm4-314	NFYQCIEYLAMKPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	39
Rm4-316	NFYQCIEALQSRPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	40
Rm4-319	NFYQCIEALSRPAEKSRGQWQECRTGG	Rm2-2-319	41
Rm4-44	NFYQCIEHLSGSPA EKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	42
Rm4-45	NFYQCIESLAGGPAEKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	43
Rm4-46	NFYQCIEALVGVPAEKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	44

Mutante	Secuencia de aminoácidos	Molde	SEQ ID NO:
Rm4-49	NFYQCIEMLSLPPAEKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	45
Rm4-410	NFYQCIEVFWGRPAEKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	46
Rm4-411	NFYQCIEQLSSGPAEKSRGQWQECRTG	Rm2-2-319	47
Rm4-415	NFYQCIELLSARPAEKSRGQWAECRAG	Rm2-2-316	48
Rm4-417	NFYQCIEALARTPAEKSRGQWVECRAP	Rm2-2-218	49

Ejemplo 7. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a Ang-2, de unión a ErbB2

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a Ang-2 (L17) fusionado a la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2. Se usó la secuencia conectora corta, la secuencia conectora larga o el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera como conector. La figura 5 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido conector corto (GGGS (SEQ ID NO:1)) (L17-sL-Her), como una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido conector corto (Her-sL-L17), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el 4.º bucle en la región constante de cadena ligera (Her-lo-L17) o una fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido conector largo (SSGGGSGGGGGSSSRSS (SEQ ID NO:19)) (L17-1L-Her). ErbB2 se unió con grados variables por todas las construcciones. Sin embargo, Ang-2 se unió únicamente por Her-sL-L17 y L17-1L-Her.

Ejemplo 8. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a Ang-2, de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos

Se generó la fusión de un MRD dirigido a Ang-2 (L17) al extremo N o al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo Met, que se une al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. Se usó la secuencia conectora corta o la secuencia conectora larga como conector. La figura 6 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo Met con el péptido conector corto (GGGS (SEQ ID NO:1)) (L17-sL-Met), fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo Met con el péptido conector largo (SSGGGSGGGGGSSSRSS (SEQ ID NO:19)) (L17-IL-Met) y fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo Met con el péptido conector largo (Met-iL-L17). La expresión y el ensayo de las construcciones de fusión resultantes de anticuerpo-MRD demostraron fuerte unión a Ang-2 cuando se usaba el péptido conector largo. La fusión del MRD dirigido a Ang-2 al extremo C de la cadena ligera del anticuerpo produjo unión ligeramente mayor a Ang-2 que la fusión dirigida a Ang-2 al extremo N de la cadena ligera del anticuerpo.

Ejemplo 9. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina, de unión a ErbB2

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) fusionado a la cadena ligera de un anticuerpo Herceptin que se une a ErbB2 (Her). Se usó la secuencia conectora corta, la secuencia conectora larga o el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera como conector. La figura 7 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a la integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el corto péptido conector (GGGS (SEQ ID NO:1)) (RGD4C-sL-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido conector corto (Her-sL-RGD4C), una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el 4.º bucle en la región constante de cadena ligera (Her-lo-RGD4C) o una fusión N-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido conector largo (SSGGGSGGGGGSSSRSS (SEQ ID NO:19)) (RGD4C-IL-Her). ErbB2 se unió con grados variables por todas las construcciones. Sin embargo, la integrina $\alpha\beta 3$ se unió únicamente por RGD4C-IL-Her.

Ejemplo 10. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina, de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) fusionado a la cadena ligera de un anticuerpo que se une al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met). Se usaron construcciones de anticuerpo-MRD que contienen la secuencia conectora larga. La figura 8 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (RGD4C-IL-Met) o una fusión C-terminal del MRD dirigido a la integrina $\alpha\beta 3$ con el anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met-IL-RGD4C). El RGD4C-IL-Met demostró fuerte unión a integrina $\alpha\beta 3$.

Ejemplo 11. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina, de unión a ErbB2

Se construyeron anticuerpos que contienen un MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina (RP) fusionado a la cadena ligera de un anticuerpo que se une a ErbB2 (Her). Se usó el péptido conector corto, el

péptido conector largo o el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera como conector. (Carter et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de mayo de 1992; 89(10):4285-9.

PMID: 1350088 [PubMed - incluido por MEDLINE]; patente de Estados Unidos n.º 5.677.171; depósito ATCC 10463). La figura 9 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el conector corto (RP-sL-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 y el péptido conector corto (Her-sL-RP), una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el 4.º bucle de la región constante de la cadena ligera (Her-lo-RP), una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido conector largo (RP-IL-Her) o una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo contra ErbB2 con el péptido conector largo (Her-IL-RP). ErbB2 se unió con grados variables por todas las construcciones. El receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina su unió por RP-IL-Her.

Ejemplo 12. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a VEGF, de unión a ErbB2

Se generó la fusión de un MRD dirigido a VEGF (V114) al extremo N de la cadena ligera de un anticuerpo de unión a ErbB2 (Her). Se usó un péptido conector mediano (SSGGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO:2)) como conector. La figura 10 representa los resultado de un ELISA usando una construcción que contiene una fusión N-terminal del MRD dirigido a VEGF con el anticuerpo de unión a ErbB2 con el péptido conector mediano (V114-mL-Her). La expresión y ensayo de la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante demostró fuerte unión a VEGF y ErbB2.

Ejemplo 13. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina

Se estudió la fusión de un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD) al extremo N de la cadena ligera de 38C2 usando el péptido conector mediano como conector. La figura 11 demuestra que la expresión y ensayo de la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante tenía fuerte unión a integrina $\alpha\beta 3$.

Ejemplo 14. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a Ang-2

Se estudió la fusión de un MRD dirigido a Ang-2 (L17) al extremo C de la cadena ligera de 38C2 usando la secuencia conectora corta como conector. La figura 12 demuestra que la expresión y ensayo de la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante tenía fuerte unión a Ang-2.

Ejemplo 15. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina y Ang-2, de unión a ErbB2

Se conectó un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) al extremo N de la cadena ligera de un anticuerpo dirigido a ErbB2 (Her) con un conector mediano, y se conectó un MRD dirigido a Ang-2 (L17) por un conector corto al extremo C del mismo anticuerpo dirigido a ErbB2 (RGD4C-mL-Her-sL-L17). La figura 13 demuestra que la construcción de fusión de anticuerpo-MRD resultante se unía a integrina, Ang-2 y ErbB2.

Ejemplo 16. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina, de unión a ErbB2

Se construyó un anticuerpo que contiene un MRD dirigido a integrina $\alpha\beta 3$ (RGD4C) fusionado al extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo que se une a ErbB2 (Her) usando el conector mediano como conector (RGD4C-mL-her-pesada). La figura 14 representa los resultados de un ELISA usando la construcción. Tanto la integrina como ErbB2 se unieron por la construcción.

Ejemplo 17. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina, Ang-2 o al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina y de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos o ErbB2 con el péptido conector corto

Se construyeron moléculas de anticuerpo-MRD que contienen anticuerpos de unión a ErbB2 o receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, y regiones MRD dirigidas a integrina $\alpha\beta 3$, Ang-2 o el receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina ligadas con el péptido conector corto a la cadena ligera del anticuerpo. La figura 15 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang-2 fusionado al anticuerpo contra ErbB2 (L17-sL-Her), una fusión N-terminal de MRD dirigido a integrina con el anticuerpo contra ErbB2 (RGD4C-sL-Her), una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo de unión a ErbB2 (RP-sL-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (L17-sL-Met), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo de unión a ErbB2 (Her-sL-L17), una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina con el anticuerpo de unión a ErbB2 (Her-sL-RGD4C) o una fusión C-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina por el anticuerpo de unión a ErbB2 (Her-sL-RP). ErbB2 se unió con grados variables por las construcciones de anticuerpo-MRD, con la excepción de la construcción que contenía el

anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. El antígeno se unió únicamente por la construcción Her-sL-L17.

Ejemplo 18. Moléculas de anticuerpo-MRD dirigidas a integrina, Ang-2 o al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina y de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos o ErbB2 con el péptido conector largo

Se construyeron moléculas de anticuerpo-MRD que contienen anticuerpos de unión a ErbB2 o receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, y regiones MRD dirigidas a integrina $\alpha\beta 3$, Ang-2 o el receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina ligadas con el péptido conector largo a la cadena ligera del anticuerpo. La figura 16 representa los resultados de un ELISA usando construcciones que contienen una fusión N-terminal del MRD dirigido a Ang-2 fusionado al anticuerpo contra ErbB2 (L17-IL-Her), una fusión N-terminal de MRD dirigido a integrina con el anticuerpo contra ErbB2 (RGD4C-IL-Her), una fusión N-terminal del MRD dirigido al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina con el anticuerpo de unión a ErbB2 (RP-IL-Her), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (L17-IL-Met), una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (RGD4C-IL-Met), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina (Her-IL-Met), una fusión C-terminal del MRD dirigido a Ang-2 con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met-IL-L17) o una fusión C-terminal del MRD dirigido a integrina con el anticuerpo de unión al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (Met-IL-RGD4C). Como se muestra en la figura 16, las fusiones de anticuerpo-MRD son eficaces para unirse al antígeno y ErbB2. Lu et al., J Biol Chem. 20 de mayo de 2005;280(20):19665-72. Epub 9 de marzo de 2005; Lu et al., J Biol Chem. 23 de enero de 2004;279(4):2856-65. Epub 23 de octubre de 2003.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
BARBAS, Carlos F. III

<120> DIRECCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE UN DOMINIO DE RECONOCIMIENTO MODULAR

<130> P50112EP1/AC

<150> US 61/022.767

<151> 22-01-2008

<150> US 61/018.816

<151> 03-01-2008

<160> 58

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

ES 2 689 274 T3

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser
 1 5 10 15

5 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

Tyr Cys Arg Gly Asp Cys Thr
 1 5

15 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

Pro Cys Arg Gly Asp Cys Leu
 1 5

25 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 5

Thr Cys Arg Gly Asp Cys Tyr
 1 5

40 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

Leu Cys Arg Gly Asp Cys Phe
 1 5

50 <210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 7

ES 2 689 274 T3

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asp Leu Glu Gln Arg
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
 20 25

5 <210> 8
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 8

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asn Asp Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
 20 25

15 <210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 9

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Ala Thr Glu Thr Arg
 1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu
 20 25

25 <210> 10
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 10

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Trp Asp Pro Trp Thr
 35 40 45

Cys Glu His Met Leu Glu
 50

ES 2 689 274 T3

Ser Phe Tyr Ser Cys Leu Glu Ser Leu Val Asn Gly Pro Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Asp Gly Cys Arg Lys Lys
 20 25

5 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 15

Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly
 1 5 10

15 <210> 16
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 16

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Leu Glu Lys Ala Tyr Asn Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

25 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

30 <210> 17
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética
 35 <400> 17

ES 2 689 274 T3

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Trp Ile Ala Trp Glu Glu Ile
 1 5 10 15

Arg Asn Leu Pro Asn Leu Asn Gly Trp Gln Met Thr Ala Phe Ile Ala
 20 25 30

Ser Leu Val Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50

55

5 <210> 18
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Asn Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Ser Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

15 <210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 19

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg
 1 5 10 15

25 Ser Ser

30 <210> 20
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 689 274 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 20

5

Met Gly Ala Gln Thr Asn Phe Met Pro Met Asp Asn Asp Glu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Tyr Glu Gln Phe Ile Leu Gln Gln Gly Leu Glu Gly Gly Ser Gly
20 25 30

Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Leu Gly Ala Gln Thr Asn
35 40 45

Phe Met Pro Met Asp Asn Asp Glu Leu Leu Leu Tyr
50 55 60

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 21

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ala Pro Trp Thr Cys Glu His Met
1 5 10 15

<210> 22

20 <211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(50)

30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (57)..(106)

35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 22

ES 2 689 274 T3

Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Glu Phe Ala Pro Trp Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa
 65 70 75 80

Xaa
 85 90 95

Xaa
 100 105

5 <210> 23
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 23

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ala Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ala Pro Trp Thr
 35 40 45

Cys Glu His Met Leu Glu
 50

15 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 24

25 Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Leu Ala Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10 15

ES 2 689 274 T3

<210> 25
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(106)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 15
 <400> 25
 20
 Xaa
 1 5 10 15
 Xaa
 20 25 30
 Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Glu Leu Ala Pro Trp Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60
 Xaa
 65 70 75 80
 Xaa
 85 90 95
 Xaa
 100 105
 <210> 26
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Construcción sintética
 30
 <400> 26

ES 2 689 274 T3

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Leu Ala Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Leu Ala Pro Trp Thr
 35 40 45

Cys Glu His Met Leu Glu
 50

5 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 27

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ser Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10 15

15 <210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(106)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 28

ES 2 689 274 T3

Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Glu Phe Ser Pro Trp Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa
 65 70 75 80

Xaa
 85 90 95

Xaa
 100 105

5 <210> 29
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 29

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ser Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ser Pro Trp Thr
 35 40 45

Cys Glu His Met Leu Glu
 50

15 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 689 274 T3

<400> 30

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Leu Glu Pro Trp Thr Cys Glu His Met
 1 5 10 15

5 <210> 31
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (57)..(106)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 31

Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Glu Leu Glu Pro Trp Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

Xaa
 65 70 75 80

Xaa
 85 90 95

25 Xaa
 100 105

30 <210> 32
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 32

ES 2 689 274 T3

Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Leu Glu Pro Trp Thr Cys Glu His Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Leu Glu Pro Trp Thr
35 40 45

Cys Glu His Met Leu Glu
50

5 <210> 33
<211> 54
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 33
Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ala Pro Trp Thr Cys Glu His Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Leu Ala Pro Trp Thr
35 40 45

Cys Glu His Met Leu Glu
50

15 <210> 34
<211> 54
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 34
Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ala Pro Trp Thr Cys Glu His Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Gly Ser Ala Thr His Gln Glu Glu Cys Glu Phe Ser Pro Trp Thr
35 40 45

Cys Glu His Met Leu Glu
50

25

ES 2 689 274 T3

5
 <210> 35
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10
 <400> 35

Asn	Phe	Tyr	Gln	Cys	Ile	Glu	Met	Leu	Ala	Ser	His	Pro	Ala	Glu	Lys
1				5					10					15	

Ser	Arg	Gly	Gln	Trp	Gln	Glu	Cys	Arg	Thr	Gly	Gly
			20					25			

15
 <210> 36
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 36

Asn	Phe	Tyr	Gln	Cys	Ile	Glu	Gln	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ala	Glu	Lys
1				5					10					15	

Ser	Arg	Gly	Gln	Trp	Gln	Glu	Cys	Arg	Thr	Gly	Gly
			20					25			

25
 <210> 37
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 37

Asn	Phe	Tyr	Gln	Cys	Ile	Asp	Leu	Leu	Met	Ala	Tyr	Pro	Ala	Glu	Lys
1				5					10					15	

Ser	Arg	Gly	Gln	Trp	Gln	Glu	Cys	Arg	Thr	Gly	Gly
			20					25			

35
 <210> 38
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Construcción sintética

45
 <400> 38

ES 2 689 274 T3

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Arg Leu Val Thr Gly Pro Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly Gly
 20 25

5 <210> 39
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 39

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Tyr Leu Ala Met Lys Pro Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly Gly
 20 25

15 <210> 40
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 40

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Ala Leu Gln Ser Arg Pro Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly Gly
 20 25

25 <210> 41
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 41

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Ala Leu Ser Arg Ser Pro Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly Gly
 20 25

35 <210> 42
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 689 274 T3

<400> 42

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu His Leu Ser Gly Ser Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly
20 25

5 <210> 43
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 43

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Ser Leu Ala Gly Gly Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly
20 25

15 <210> 44
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 44

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Ala Leu Val Gly Val Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly
20 25

30 <210> 45
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 45

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Met Leu Ser Leu Pro Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly
20 25

40 <210> 46
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

ES 2 689 274 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 46

5

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Val Phe Trp Gly Arg Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly
20 25

<210> 47

<211> 27

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 47

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Gln Leu Ser Ser Gly Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly
20 25

<210> 48

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<400> 48

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Leu Leu Ser Ala Arg Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Ala Glu Cys Arg Ala Gly
20 25

30

<210> 49

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 49

40

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Glu Ala Leu Ala Arg Thr Pro Ala Glu Lys
1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Val Glu Cys Arg Ala Pro
20 25

ES 2 689 274 T3

5
 <210> 50
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10
 <400> 50
 gtggagtgca gggcgccg 18

<210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20
 <400> 51

Val Glu Cys Arg Ala Pro
 1 5

25
 <210> 52
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

30
 <400> 52
 gctgagtgca gggctggg 18

35
 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 53

Ala Glu Cys Arg Ala Gly
 1 5

45
 <210> 54
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

50
 <400> 54
 caggagtgca ggacgggg 18

55
 <210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 689 274 T3

Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Ala Gln Gln Glu Glu Cys Glu Xaa Xaa Pro Trp Thr Cys Glu
 50 55 60

His Met Xaa
 65 70 75 80

Xaa
 85 90 95

Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa
 115

5 <210> 58
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es E o D

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 58

Asn Phe Tyr Gln Cys Ile Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Pro Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Trp Gln Glu Cys Arg Thr Gly Gly
 20 25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de longitud completa aislado que comprende al menos un dominio de reconocimiento modular (MRD), en el que el MRD es de 2 a 60 aminoácidos y la diana del MRD es angiopoyetina-2 (Ang-2), en el que la diana del sitio de combinación de anticuerpo es un antígeno tumoral, y en el que el MRD está unido de forma funcional al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo, el extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo o el extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo y en el que el MRD comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 5
- 10 MGAQTNFMPMDMLEQRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:7),
MGAQTNFMPMDNDELLLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:8),
MGAQTNFMPMDATETRLYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:9),
- AQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWD
- 15 PWTCEHMLE (SEQ ID NO:10),
- AQEECEFAPWTCEHM (SEQ ID NO:21)
- AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFAPWTCE
- 20 HMLE (SEQ ID NO:23),
- AQEECELAPWTCEHM (SEQ ID NO:24),
- AQEECELAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCE
- 25 HMLE (SEQ ID NO:26),
- AQEECEFSPWTCEHM (SEQ ID NO:27),
AQEECEFSPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEH MLE2xConFS (SEQ ID NO:29),
AQEECELEPWTCEHM (SEQ ID NO:30),
- 30 AQEECELEPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELEPWTCE
- HMLE (SEQ ID NO:32),
- AQEECEFAPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECELAPWTCE
- 35 HMLE (SEQ ID NO:33);
- AQEECEF
- APWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEFSPWTCEHMLE (SEQ ID NO:34),
- 35 MGAQTNFMPMDNDELLNYEQFILQQGLE (SEQ ID NO:11) y
PXDNXLLNY (SEQ ID NO:12), en el que X se selecciona de uno de los 20 aminoácidos de origen natural.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo y el MRD están unidos de forma funcional mediante un péptido conector.
- 40 3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el péptido conector es entre 2 a 20 aminoácidos o entre 4 a 15 aminoácidos.
4. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el péptido conector comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: GGGS (SEQ ID NO:1), SSGGGSGGGGGSS (SEQ ID NO:2) y SSGGGSGGGGGSSRSS (SEQ ID NO:19).
- 45 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el MRD está unido de forma funcional extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo o el extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dos o más MRD están unidos de forma funcional a cualquier extremo terminal del anticuerpo o en el que dos o más MRD están unidos de forma funcional a dos o más extremos terminales del anticuerpo.
- 5 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sitio de combinación de anticuerpo se une a un antígeno de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en: EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, CD20, receptor del factor I de crecimiento de tipo insulina y antígeno de membrana específico de próstata.
- 10 8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo es Trastuzumab.
9. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 15 10. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.
11. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 10, o la descendencia de la célula.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad.
- 20 13. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad es cáncer.
14. El anticuerpo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en el que el anticuerpo inhibe la angiogénesis, modula la angiogénesis o inhibe el crecimiento tumoral.

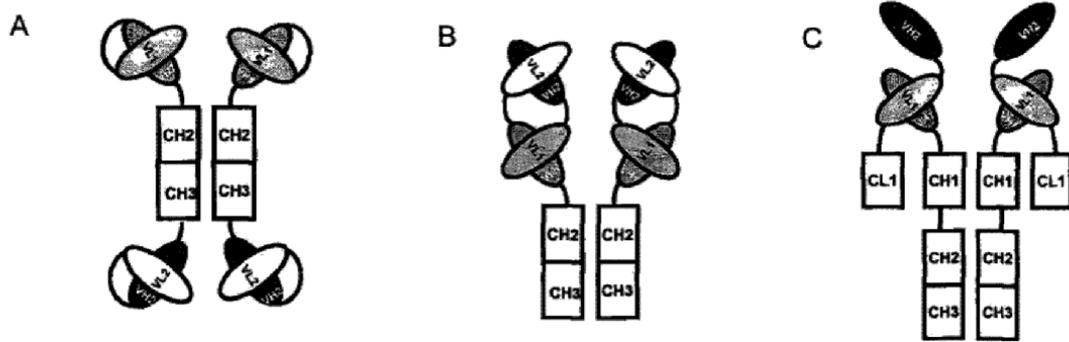


FIG. 1

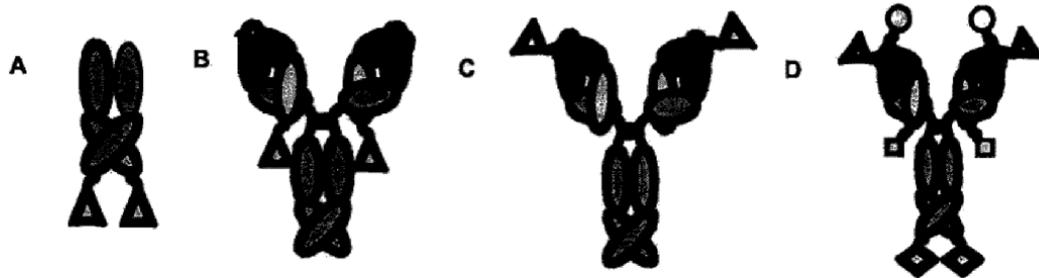


FIG. 2

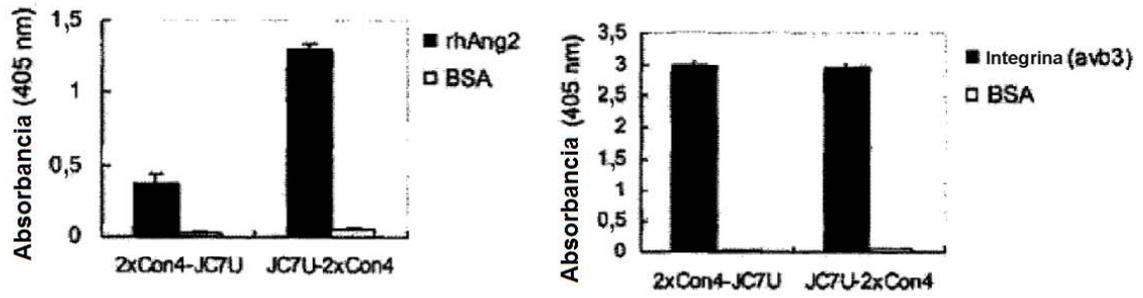


FIG. 3

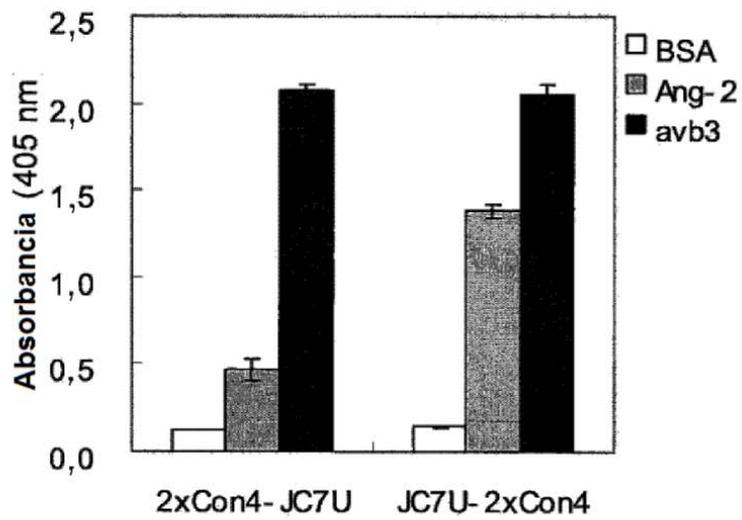


FIG. 4

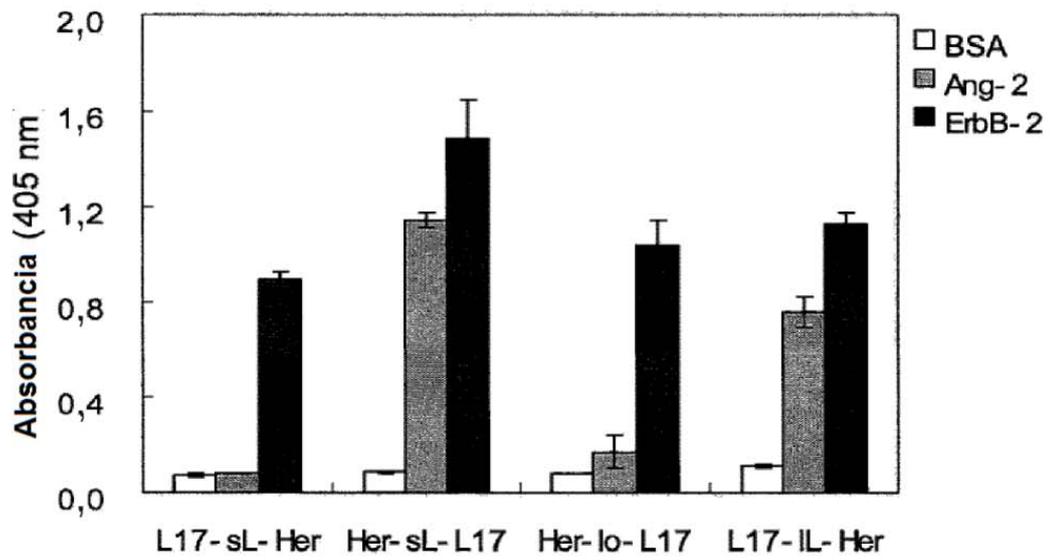


FIG. 5

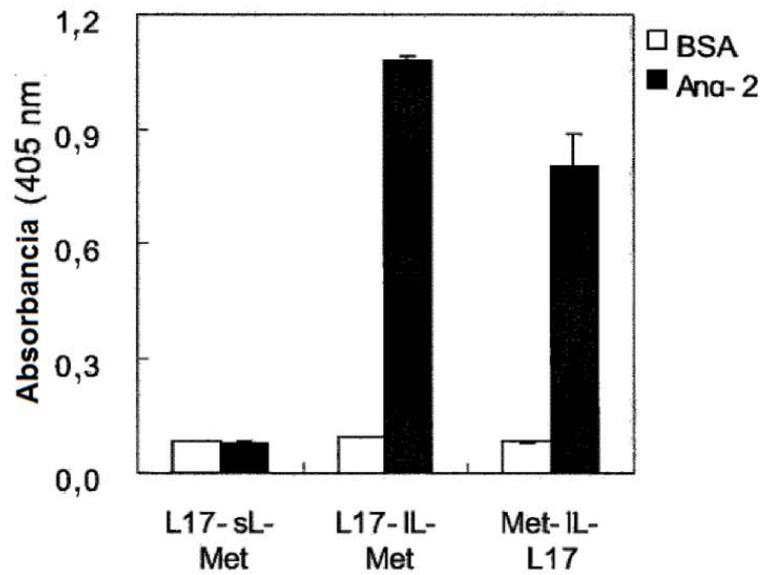


FIG. 6

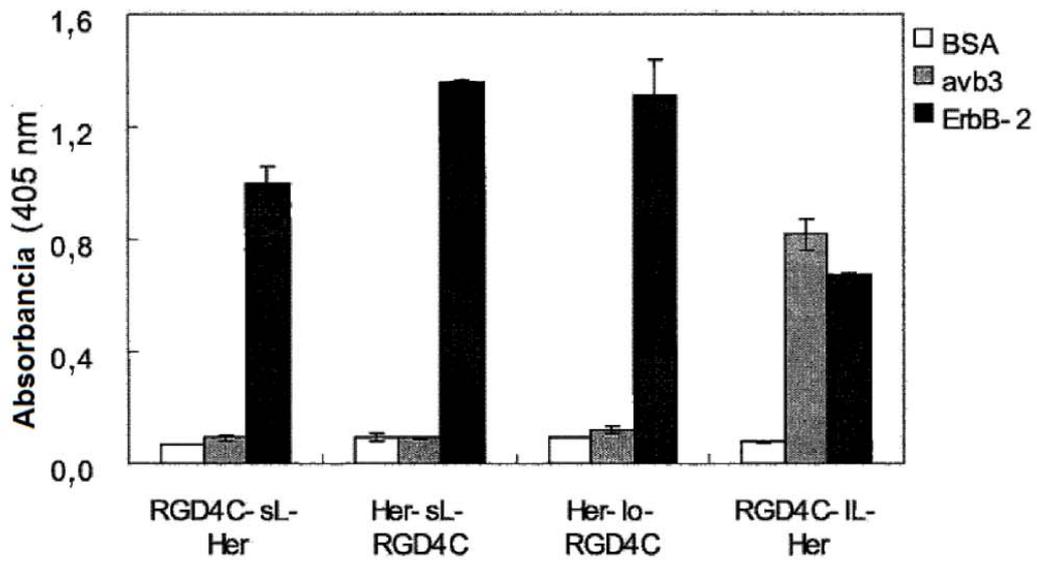


FIG. 7

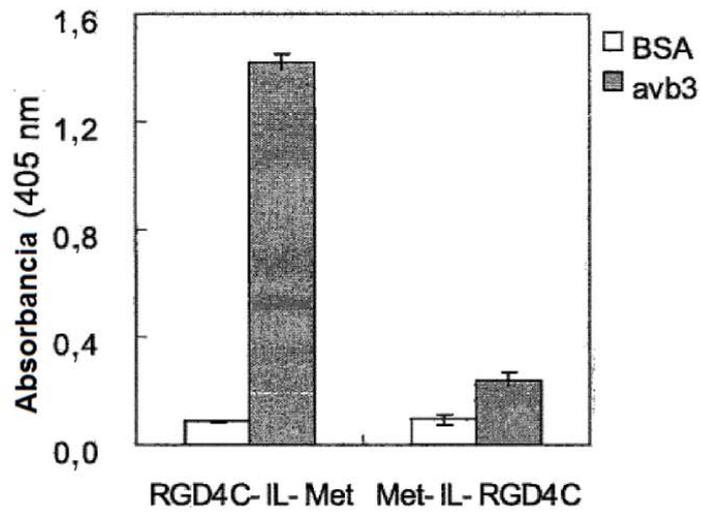


FIG. 8

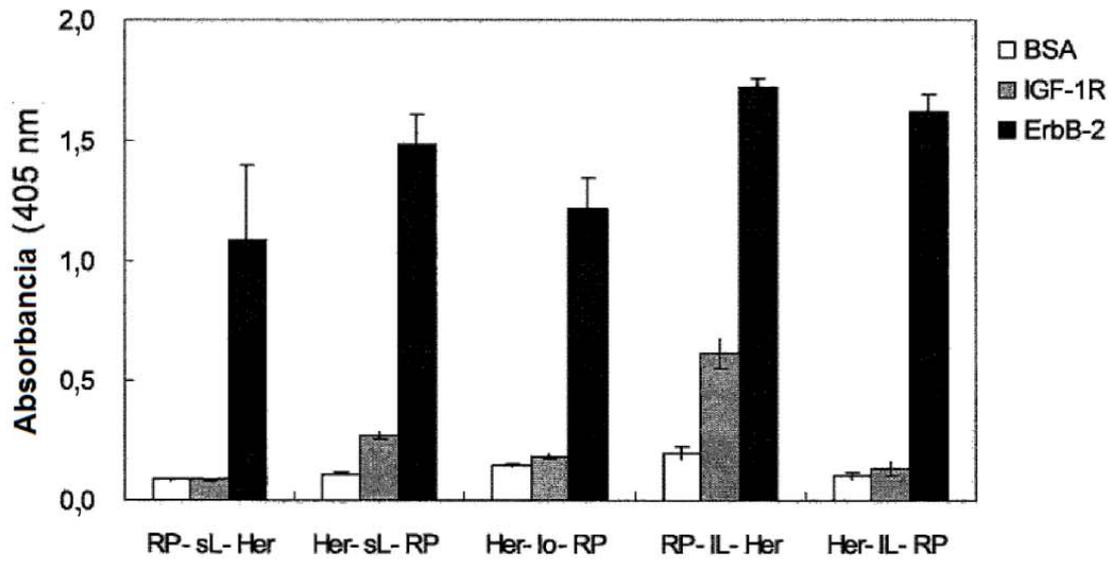


FIG. 9

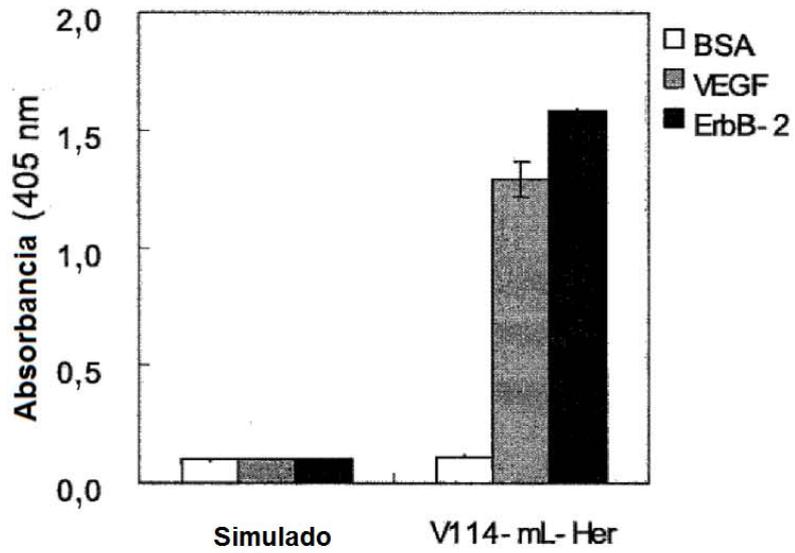


FIG. 10

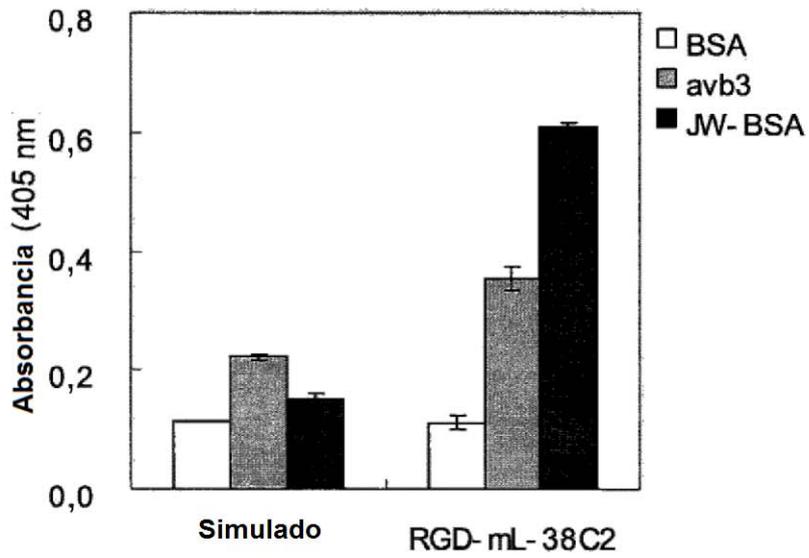


FIG. 11

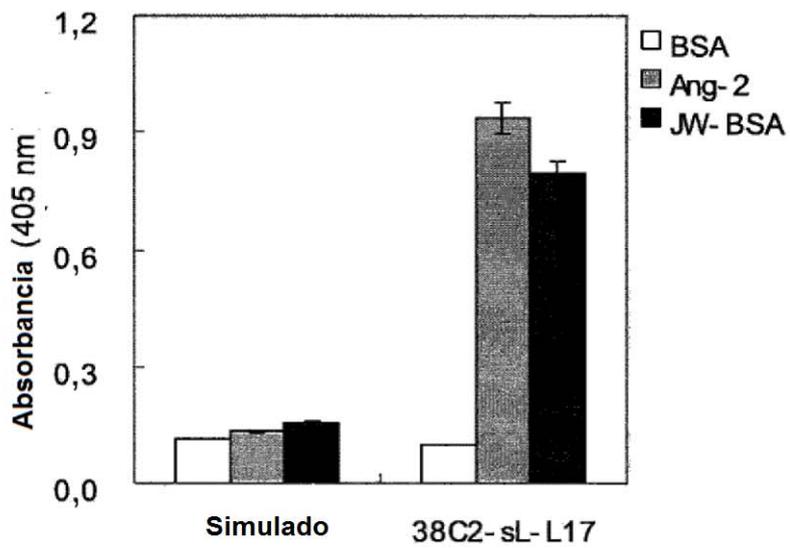


FIG. 12

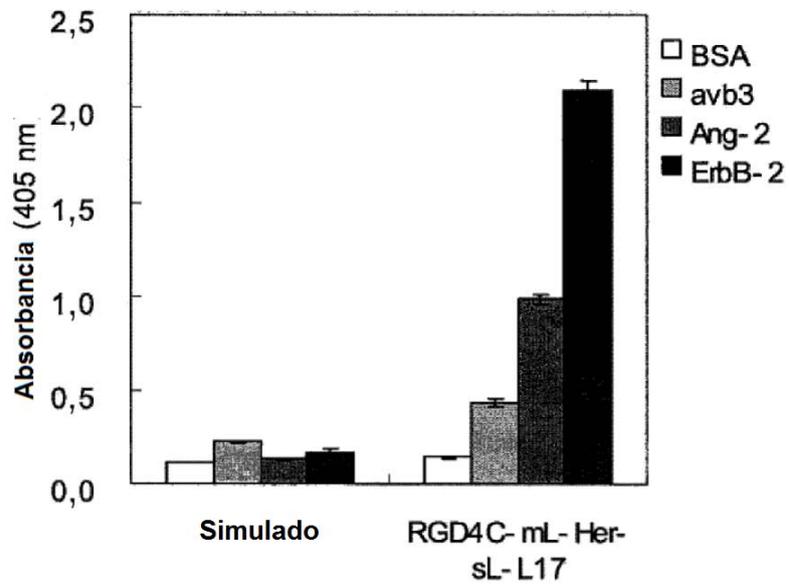


FIG. 13

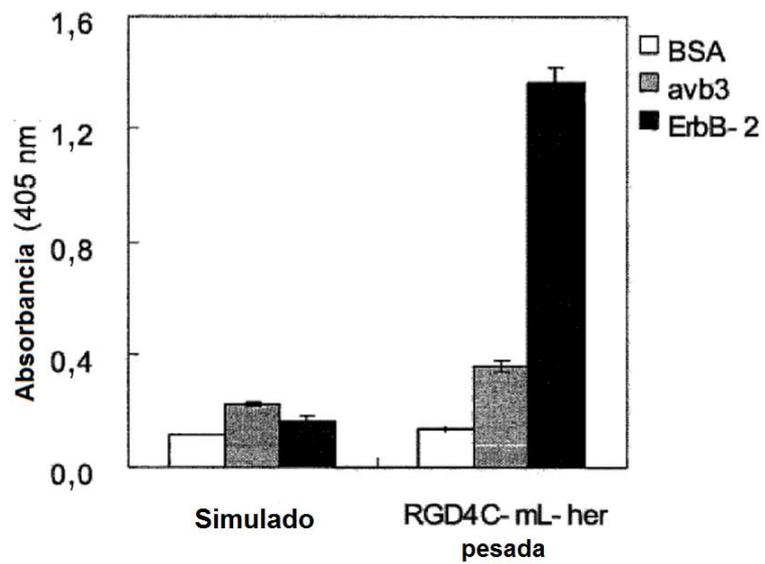


FIG. 14

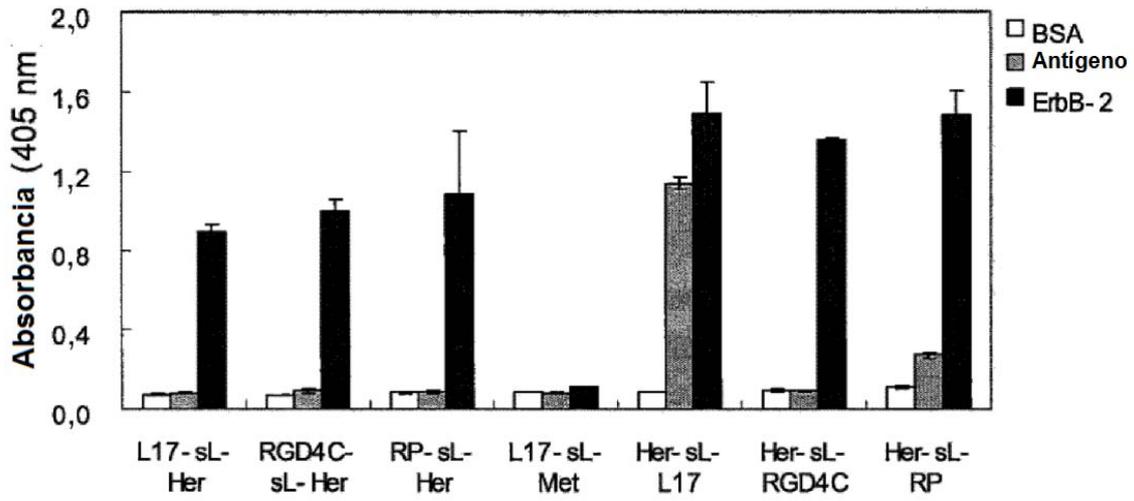


FIG. 15

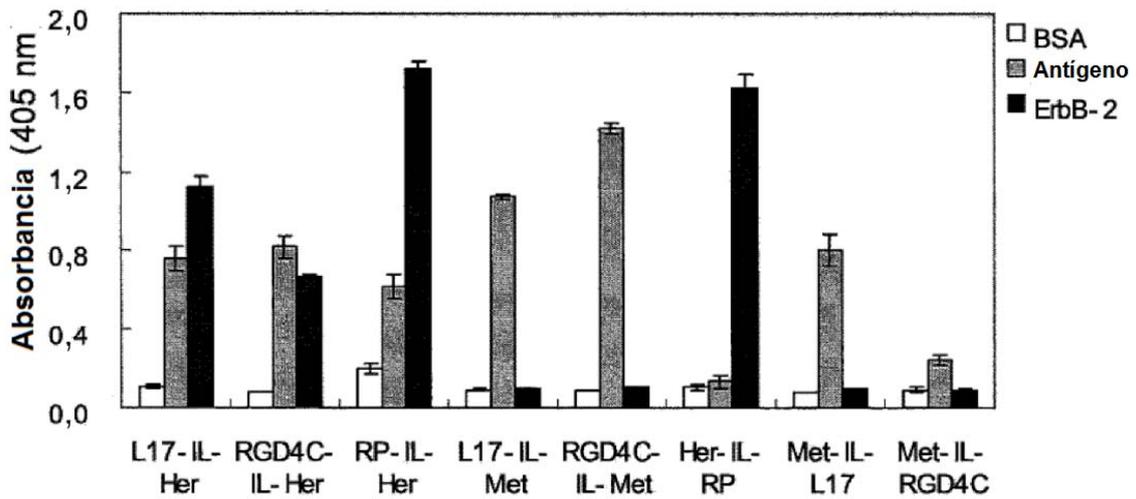


FIG. 16