(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 701 188**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/65 (2007.01)
A61K 47/68 (2007.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2015 PCT/EP2015/052342**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118031**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2015 E 15705779 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3102606**

(54) Título: **Conjugados anticuerpo-fármaco e inmunotoxinas**

(30) Prioridad:

06.02.2014 GB 201402009

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2019

(73) Titular/es:

ONCOMATRYX BIOPHARMA, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia Edificio 801-B 2° planta
48160 Derio (Vizcaya), ES

(72) Inventor/es:

KONTERMANN, ROLAND;
PFIZENMAIER, KLAUS;
FERRER, CRISTINA;
FABRE, MYRIAM y
SIMON, LAUREANO

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Conjugados anticuerpo-fármaco e inmunotoxinas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) e inmunotoxinas que se dirigen a la endoglina (ENG) y a su uso en medicina, por ejemplo, en el tratamiento de determinados cánceres.

Antecedentes de la invención

Los tumores epiteliales malignos son la causa principal de muertes humanas relacionadas con el cáncer. Estos tumores sólidos con frecuencia presentan reacciones estromales significativas tales como el denominado "estroma desmoplásico" o "estroma reactivo", que representa el 20-60 % de la masa tumoral total y se caracteriza por la existencia de grandes cantidades de células estromales y una matriz extracelular densa (MEC). Los estudios recientes han indicado las funciones promotoras de las células estromales, tal como se ejemplifica mediante las células vasculares, las células inmunitarias, los fibroblastos, los miofibroblastos, los adipocitos y las células precursoras que derivan de la médula ósea *(1-6)*. En particular, a menudo se observa un número considerable de fibroblastos asociados al cáncer (FAC) en el estroma asociado al tumor de diversos cánceres humanos, incluyendo carcinomas de mama, de pulmón, de colon y de páncreas *(14, 15)*. Interactuando de manera coordinada con los diferentes componentes del estroma, los FAC tienen la capacidad de promover la neoangiogénesis y el crecimiento tumoral; también se ha demostrado que los FAC son cruciales para el desarrollo de tumores agresivos y la invasión durante la progresión del cáncer *(16-25);* los FAC facilitan la difusión y la infiltración de células tumorales en órganos alejados, contribuyendo de este modo a la formación de metástasis. De manera importante, también se ha indicado la relevancia de las células estromales en el fracaso de la administración sistémica del fármaco a los tumores y al desarrollo de la resistencia al fármaco *(7-11)*. La identificación de dianas celulares y moleculares que anulan las interacciones de células estromales-células tumorales y, por lo tanto, que atenúan la tumorigénesis es actualmente uno de los temas en oncología traslacional. De hecho, el direccionamiento al estroma peritumoral es una estrategia bastante nueva para tratar tumores metastásicos, que representan más del 90 % de la mortalidad de los pacientes de cáncer: solo unos pocos productos han obtenido la aprobación terapéutica hasta la fecha, siendo la mayoría de ellos fármacos anti-angiogénicos (Avastin®; *26)*. La identificación y el direccionamiento hacia otras nuevas moléculas en el microambiente tumoral es, por lo tanto, esencial para aumentar la eficacia de las terapias convencionales en combinación con las estrategias terapéuticas basadas en el estroma, y representa una poderosa estrategia para el tratamiento del cáncer y de la metástasis *(12, 13)*.

Los fármacos basados en anticuerpos monoclonales (MAb) representan una gran promesa en la lucha frente al cáncer. Esto se debe a que permiten que el tratamiento se dirija a nivel molecular de una forma precisa y específica. Estas ventajas, junto con su atractivo comercial (tienen cortos períodos de desarrollo, competencia restringida y son fácilmente exportables a otros tipos de cánceres una vez que se han aprobado), han empujado a muchas compañías farmacéuticas a invertir en el desarrollo de nuevas moléculas basadas en anticuerpos, así como en la concesión de licencias de nuevas moléculas o tecnologías de compañías de biotecnología.

Sin embargo, a pesar del éxito clínico de los anticuerpos terapéuticos, los MAb no marcados que se dirigen a los antígenos tumorales de superficie celular raramente presentan una eficacia suficiente por sí mismos. Para aumentar la baja actividad de los MAb, las nuevas estrategias se centran en unirlos a moléculas tóxicas. Las toxinas vegetales y bacterianas, así como pequeñas moléculas quimioterapéuticas pueden ser buenos candidatos, dado que son muy potentes y activos en muy pequeñas cantidades.

El campo de las inmunotoxinas (IT) y de los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) para el tratamiento del cáncer ha experimentado recientemente una creciente actividad de desarrollo por las compañías farmacéuticas, debido a los avances tecnológicos realizados durante los últimos años, centrados en resolver los problemas que inicialmente presentaban sobre inmunogenicidad, toxicidad indeseable, producción, semivida y resistencia.

Los inmunoconjugados están hechos de un anticuerpo recombinante humano, humanizado o quimérico, unido covalentemente a un fármaco citotóxico. La meta principal de tal estructura es unir el poder de los citotóxicos pequeños (300 a 1000 Da) y la alta especificidad de los MAb dirigidos al antígeno asociado al tumor (AAT).

El Ab (del inglés *antibody*, anticuerpo) debe ser muy selectivo para alcanzar el antígeno, cuya expresión debe estar restringida en células normales. El Ab también se debe internalizar de manera eficaz en las células cancerosas.

El agente citotóxico seleccionado como el resto efector debe eliminar las células solo tras la internalización y liberarse en el citoplasma celular. Las cargas útiles más comúnmente usadas en los CAF son fármacos que dañan el ADN tales como las caliqueamicinas, duocarmicinas o compuestos que se dirigen a los microtúbulos como auristatinas y matansinoides.

Los enlazadores de Ab-citotóxico se diseñan para que sean sistémicamente estables y para liberar el citotóxico en las células diana.

Los AAT normalmente son proteínas de membrana celular que se sobreexpresan en tejidos enfermos o que al menos se expresan lo suficiente como para facilitar la citotoxicidad activada por la internalización. Idealmente, el antígeno presenta una expresión restringida en tejidos normales con una expresión baja o ausente en los órganos vitales. Además, el antígeno tumoral se debe reconocer de manera selectiva y con alta afinidad por un Ab.

Los estudios recientes sugieren que los agentes terapéuticos diseñados para inhibir la vía de señalización de TGF-β en la interfase tumor-estroma podría evitar la progresión del cáncer, mejorando el pronóstico y el tratamiento. La familia del correceptor de TGF-β está surgiendo como una diana para los tratamientos de cáncer que actúa sobre el tumor o sobre su neovasculatura. La endoglina (ENG, CD105), una proteína accesoria del complejo de receptor de TGF-β de tipo II, es parte de esta familia y presenta las siguientes características:

- Proteína de membrana homodímera de tipo I
- Proteína asociada a la angiogénesis de superficie celular y neovascularización en muchos tipos de cánceres
- Sobreexpresada en las células de la microvasculatura del tumor, específicamente en áreas angiogénicas del tumor
- Sin expresión en endotelio de tejido normal
- Niveles plasmáticos correlacionados con metástasis de mama
- Internalización
- Accesibilidad óptima del torrente sanguíneo

Se han documentado anticuerpos anti-ENG (por ejemplo, scFv) y se ha descrito su aplicación en estrategias de direccionamiento de estroma tumoral. La unión específica, la internalización celular y los efectos antitumorales de inmunoliposomas anti-ENG cargados con doxorrubicina se han documentado *in vitro*, usando células ENG+, e *in vivo* en ratones. Los conjugados dirigidos a ENG de anticuerpos anti-EMG y ricina o nigrina b natural se han evaluado en modelos de tumor de ratones *(27-36).*

El documento WO 2012/135517 A2 describe métodos para la preparación de conjugados anticuerpo-fármaco.

Ferreras *et al., Toxins,* 2011, Vol.3, pp. 420-441, describen el uso de las proteínas de inactivación de ribosoma de *Sambucus* en la construcción de inmunotoxinas y otros conjugados para la terapia del cáncer.

Challner, "Site-Specific Conjugation...", PharmTech 13 Nov. 213 (cita de internet) describe tecnologías de conjugación específicas de sitio.

El documento WO 2008/138561 A1 describe "derivados de tubulisina", que son moléculas citotóxicas y su uso para el tratamiento de cáncer y de otros trastornos.

Van Gorp *et al.*, *Eur, J. Biochem.,* Vol.237, pp. 505-513, describen la caracterización y la clonación molecular de la nigrina b, una proteína de inactivación de ribosoma de tipo 2 específica de GalNAc.

El documento WO 2010/126551 A1 describe la modificación de enlazadores que unen los fármacos a los agentes de unión celular, a enlazadores hidrófilos, dando como resultado una potencia mejorada en varios tipos de células cancerosas.

Gilabert-Oriol et al., *Current Pharmaceutical Design,* 2014, Vol. 20, N.º 42, pp. 6584-6643, describe inmunotoxinas construidas con proteínas de inactivación de ribosomas, y la mejora en la utilidad terapéutica de las mismas usando potenciadores de escape endosomal.

A pesar de estos avances, permanece una necesidad no cumplida de estrategias terapéuticas adicionales para el tratamiento de tumores, incluyendo tumores epiteliales, y de componentes para su uso en tales estrategias terapéuticas. La presente invención abarca estas y otras necesidades.

Breve descripción de la invención

En términos generales, la presente invención se refiere a conjugados anticuerpo anti-ENG - fármaco tal como se define en la reivindicación 1. En particular, los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos anti-ENG tal como se describen en el presente documento, presentan una unión altamente específica y una internalización rápida y eficaz.

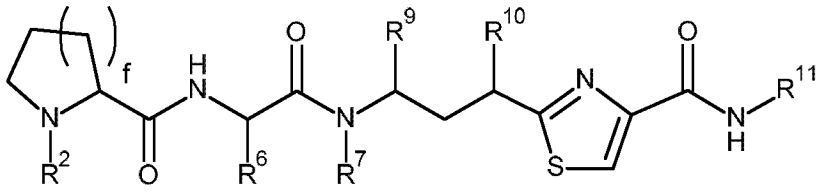
Los derivados de citolisina se conjugan de manera ventajosa con anticuerpos anti-ENG para su uso en el tratamiento de tumores.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la fórmula I:

$$A\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad (I)$$

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde:

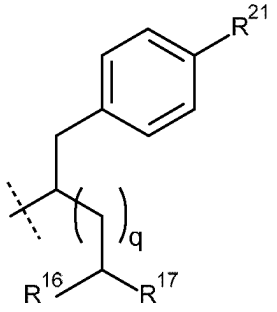
A es un anticuerpo que se une de manera selectiva a la endoglina;
L es un enlazador;
p es de 1 a 10; y
D es un fármaco que comprende una citolisina de fórmula IV:



(IV)

en donde:

R^2 es H o alquilo C_1-C_4;
R^6 es alquilo C_1-C_6;
R^7 es alquilo C_1-C_6, CH_2OR^{19} o CH_2OCOR^{20}, en donde R^{19} es alquilo, R^{20} es alquenilo C_2-C_6, fenilo o CH_2-fenilo;
R^9 es alquilo C_1-C_6;
R^{10} es H, OH, O-alquilo u O-acetilo;
f es 1 o 2;
R^{11} tiene la siguiente estructura:



en donde

R^{21} es H, OH, halógeno, NH_2, alquiloxi, fenilo, alquilamino o dialquilamino;
R^{16} es H o un grupo alquilo C_1-C_6;
R^{17} está unido directa o indirectamente al enlazador L; y
q es 0, 1, 2 o 3.

En algunos casos, de acuerdo con esto y otros aspectos de la presente invención, A es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al mismo que se une de manera selectiva a una región extracelular de la endoglina humana. En casos particulares, A puede comprender las regiones determinantes de complementariedad 1-3 de la cadena pesada (CDRH1-3) y las regiones determinantes de complementariedad 1-3 de la cadena ligera (CDRL1-3) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

(i) CDRH1: la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 7;
(ii) CDRH2: la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 8;
(iii) CDRH3: la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 9;
(iv) CDRL1: la SEQ ID NO: 10 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 10;
(v) CDRL2: la SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en

comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 11; y
(vi) CDRL3: la SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 12.

En determinados casos, las CDRH1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7-9, respectivamente, y las CDRL1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10-12, respectivamente.

En determinados casos, A comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 5.

En determinados casos, A comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

En determinados casos, A comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 6. En particular, A puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En determinados casos, A comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 3. En particular, A puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En determinados casos, A comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 4. En particular, A puede comprender una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En determinados casos, A puede ser un anticuerpo anti-endoglina de unión competitiva que es estructuralmente diferente de las moléculas de anticuerpo anti-endoglina que se ejemplifican en el presente documento. Por ejemplo, A puede ser una molécula de anticuerpo anti-endoglina que compite con el anticuerpo IgG1 anti-endoglina humana, identificado en el presente documento como "A5", por la unión a endoglina humana recombinante inmovilizada. A5 tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4.

En determinados casos, A es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo que se une de manera selectiva a una región extracelular de endoglina de murino. Los conjugados anticuerpo-fármaco que se dirigen a la endoglina de murino encuentran un uso particular en ensayos preclínicos, por ejemplo, empleo de modelos de murino bien caracterizados de diversos cánceres. En particular, A puede comprender las regiones determinantes de complementariedad 1-3 de la cadena pesada (CDRH1-3) y las regiones determinantes de complementariedad 1-3 de la cadena ligera (CDRL1-3) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

(i) CDRH1: la SEQ ID NO: 19 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 19;
(ii) CDRH2: la SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 20;
(iii) CDRH3: la SEQ ID NO: 21 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 21;
(iv) CDRL1: la SEQ ID NO: 22 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 22;
(v) CDRL2: la SEQ ID NO: 23 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 23; y
(vi) CDRL3: la SEQ ID NO: 24 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 24. Por ejemplo, las CDRH1-3 pueden comprender las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 19-21, respectivamente, y las CDRL1-3 pueden comprender las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 22-24, respectivamente.

En determinados casos, A comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 17, por ejemplo, A puede comprender una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En determinados casos, A comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 18, por ejemplo, A puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la

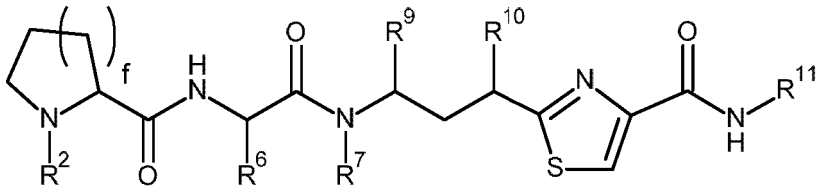
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

En determinados casos, A comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % o incluso el 100 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 15.

En determinados casos, A comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, el 95 % o el 99 % o incluso el 100 % de identidad con la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 16.

En determinados casos, A puede ser un anticuerpo anti-endoglina de unión competitiva que es estructuralmente diferente de las moléculas de anticuerpo anti-endoglina que se ejemplifican en el presente documento. Por ejemplo, A puede ser una molécula de anticuerpo anti-endoglina que compite con el anticuerpo IgG1 anti-endoglina de murino, identificado en el presente documento como "mE12", por la unión a la endoglina de murino recombinante inmovilizada. El mE12 tiene la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO: 16.

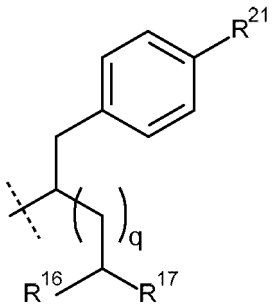
De acuerdo con este y otros aspectos de la presente invención, D comprende una citolisina de fórmula IV:



(IV)

en donde:

R^2 H o es alquilo C_1-C_4;
R^6 es alquilo C_1-C_6;
R^7 es alquilo C_1-C_6, CH2OR^{19} o CH2OCOR^{20}, en donde R^{19} es alquilo, R^{20} es alquenilo C_2-C_6, fenilo o CH2-fenilo;
R^9 es alquilo C_1-C_6;
R^{10} es H, OH, O-alquilo u O-acetilo;
f es 1 o 2;
R^{11} tiene la siguiente estructura:



en donde

R^{21} es H, OH, halógeno, NH2, alquiloxi, fenilo, alquilamino o dialquilamino;
R^{16} es H o un grupo alquilo C_1-C_6;
R^{17} está unido directa o indirectamente al enlazador L; y
q es 0, 1, 2 o 3.

En algunos casos, R^{17} es C(O)X, CONHNHX, OX, NHX o SX, en donde X es un enlace al enlazador L.

En algunos casos, el enlazador L puede comprender adicionalmente un espaciador.

En algunos casos, el espaciador tiene una longitud de cadena de 2 a 30 átomos.

En algunos casos, el espaciador comprende o consiste en un grupo alquileno (es decir, alquilo divalente) o heteroalquileno (es decir, heteroalquilo divalente). En algunos casos, el espaciador comprende o consiste en un grupo

alquileno u oxialquileno.

En algunos casos, el espaciador comprende o consiste en un grupo $-(CH_2)_n-$ o $-(OCH_2CH_2)_n-$, en donde n ≥ 1.

En algunos casos, el espaciador comprende o consiste en un grupo $-(OCH_2CH_2)_n-$, en donde n ≥ 1. En particular, n puede ser 1 a 15, 1 a 10, 1 a 6, o 2 a 5. Por ejemplo, n puede ser 3 o 4.

En algunos casos, el espaciador comprende entre una y seis unidades de etilenglicol, por ejemplo, un trietilenglicol.

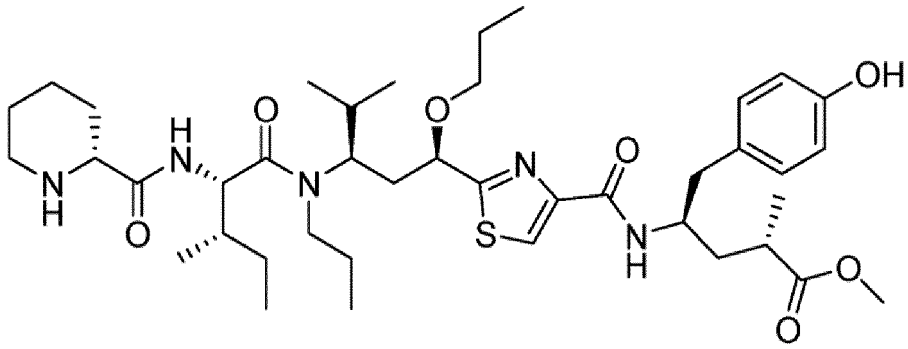
En algunos casos, el espaciador puede unirse directamente al grupo R^{17}, o se puede unir al grupo R^{17} a través de un grupo puente.

En algunos casos, el espaciador se une al grupo R^{17} a través de un grupo puente -C(O)X, en donde X es un enlace a R^{17}.

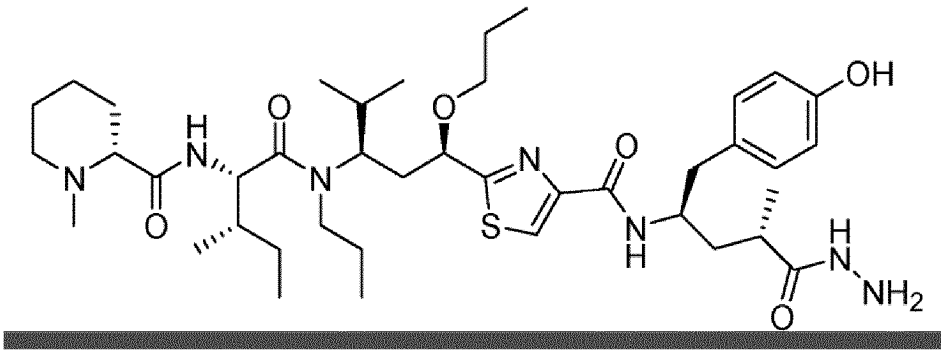
En algunos casos, R^{17} es CONHNHX y el espaciador está unido al grupo R^{17} a través de un grupo puente -C(O)X, en donde X representa la unión entre el espaciador y R^{17}.

En algunos casos, R^{17} es CONHNHX y el espaciador es un $-(OCH_2CH_2)_n-$ unido a R^{17} a través de un grupo puente -C(O)X, en donde n = 2, 3 o 4.

En algunos casos, D comprende una citolisina que tiene la siguiente estructura:



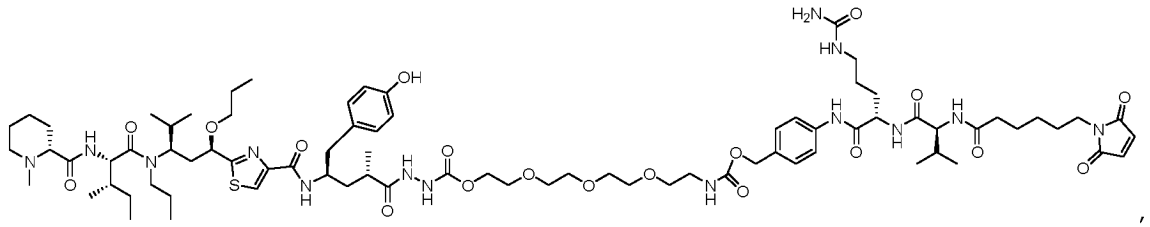
En algunos casos, D comprende una citolisina que tiene la siguiente estructura:



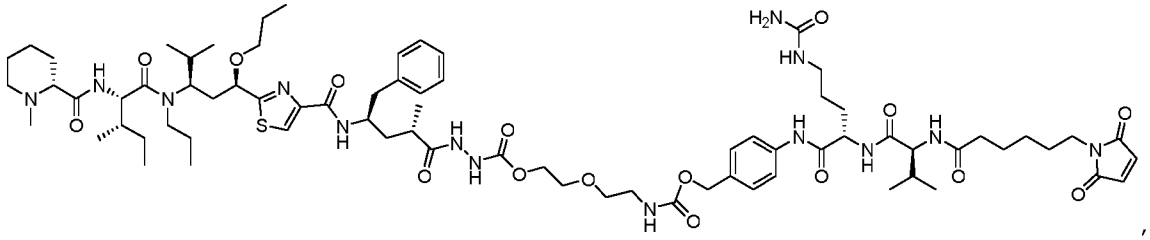
En determinados casos, L comprende un grupo de unión para la unión a A y una porción escindible de proteasa. Por ejemplo, L puede comprender una unidad valina-citrulina. En particular, L puede comprender maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobencilcarbamato.

En algunos casos, el doble enlace de la maleimida reacciona con un grupo tiol de un resto de cisteína del anticuerpo A para formar un enlace azufre-carbono con el fin de efectuar la unión del enlazador L al anticuerpo A.

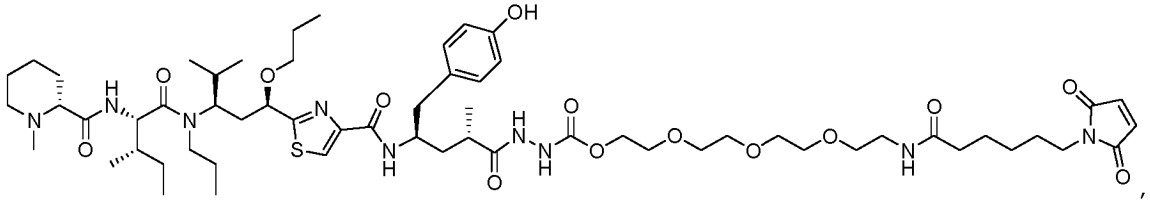
En algunos casos, -L-D tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



,

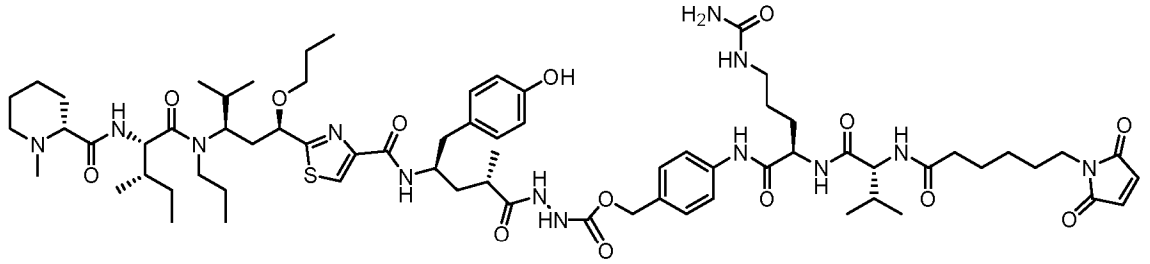


,

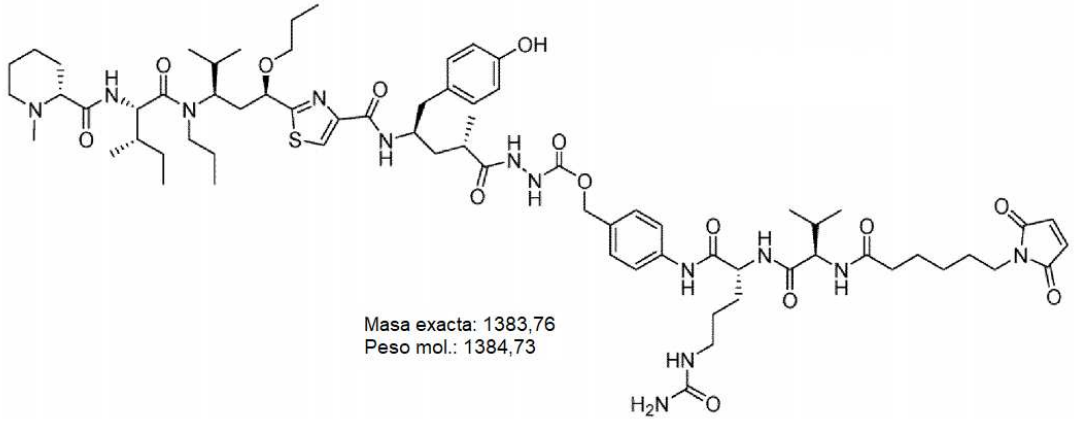


,

y



En determinados casos, -L-D puede tener la siguiente estructura:



De acuerdo con esto y otros aspectos de la presente invención, p puede, en algunos casos, estar en el intervalo de 1 a 5, por ejemplo, 1 a 4 o 1 a 3. En casos particulares, p puede ser 1 o 2. En casos particulares, p puede ser 3 o 4.

En un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco tal como se define de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en medicina.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se define de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en un método de tratamiento de un tumor en un sujeto mamífero. En determinados casos, el conjugado anticuerpo-fármaco es para su uso en el tratamiento de una neoplasia sanguínea. En determinados casos, el conjugado anticuerpo-fármaco es para su uso en el tratamiento de un tumor sólido. En particular, el conjugado anticuerpo-fármaco puede ser para su uso en el tratamiento de un cáncer de páncreas, sarcoma de Ewing, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de vejiga o cáncer de colon.

En algunos casos, el conjugado anticuerpo-fármaco es para la administración simultánea, secuencial o separada con uno o más fármacos antitumorales. Los uno o más fármacos antitumorales comprenden un agente quimioterapéutico citotóxico o un agente anti-angiogénico o un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, los uno o más fármacos antitumorales comprenden Gemcitabina, Abraxano bevacizumab, itraconazol, carboximidotriazol, una molécula anti-PD-1 o una molécula anti-PD-LI (por ejemplo, nivolumab o pembrolizumab).

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco del primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide) o una enfermedad ocular (por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular, tales como degeneración macular húmeda relacionada con la edad).

La presente invención incluye la combinación de los aspectos y rasgos preferidos descritos, exceptuando en donde tal combinación sea claramente inaceptable o se indique expresamente que tenga que evitarse. Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen con mayor detalle a continuación y con referencia a los ejemplos y figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra los resultados de ELISA de mE12-IgG para la unión a ENG recombinante de ratón (aa 27-581). Se incluyó BSA recubierto como un control negativo. Se observó una unión dependiente de la concentración a la ENG de ratón;

La **Figura 2** muestra el análisis de citometría de flujo de la unión de mE12-IgG a **a)** células B16 usando 50 µg/ml de anticuerpo, **b)** células B16 usando 5 µg/ml de anticuerpo, y **c)** células HT1080 incluidas como control negativo. Zona sombreada: células solas, zona no sombreada: células incubadas con anticuerpo;

La **Figura 3** muestra **a)** ELISA de unión de A5 IgG1 a la ENG humana recombinante inmovilizada. **b)** Análisis de citometría de flujo de la unión de A5-IgG a células HT1080;

La **Figura 4** muestra el perfil de MALDI-Tof de la cadena A de nigrina b recombinante. Masa observada (Da): 28546,55; Masa esperada (Da): 28546,09; Desviación de la masa: 0,5; Precisión de la masa: 16 ppm.

La **Figura 5** muestra la actividad de la proteína inactivadora del ribosoma (RIP) de la cadena A de nigrina b recombinante (recNgA) probada en el lisado sin células de los reticulocitos (RRL, del inglés *rabbit reticulocyte cell-free lysates*) frente a la nigrina b natural (TS) (3a, 3b, 6c, 9c) representa diferentes formulaciones de recNgA

La **Figura 6** muestra la citotoxicidad de recNgA probada en la línea celular HT1080-FAP a través del ensayo de viabilidad de cristal violeta (Nigrina natural - diamantes; cadena A de nigrina b recombinante - cuadrados)

La **Figura 7** muestra la actividad de RIP de conjugados de recNgA en un ensayo de nigrina b natural: diamantes (♦); recNgA: cuadrados (■); conjugados de recNgA en HPS-124-37-1 (triángulos: ▲) HPS-124-37-2 (cruces: **X**)

La **Figura 8** muestra la estructura general de conjugado de anticuerpo para un anticuerpo conjugado con citolisina a través de un enlazador vcPABA. La unión de la citolisina puede ser a través de Ri o R_4 (identificada mediante flechas)

La **Figura 9** muestra el análisis de la internalización de la IgG1 anti-huENG A5 mediante la discriminación de células (n=10-30) mostrando solo la tinción de membrana (PM), la tinción de PM de intracelular, o solo la tinción intracelular.

La **Figura 10** muestra el efecto citotóxico *in vitro* de los CAF en (**A**) tipo silvestre (TS) y (**B**) células HT1080 que expresan el antígeno (AG). La detención de la proliferación celular se evidenció a través de la tinción de cristal violeta tras una incubación de 72 horas de cada compuesto a un intervalo de concentración de 10^{-6} a 10^{-12}M. Se usó citolisina parental TAM334 como control positivo para la citotoxicidad inespecífica.

La **Figura 11** muestra el efecto de inhibición del crecimiento tumoral de inmunoconjugados de recNgA y citolisina. **(A)** conjugados de recNgA, administrados como agente único (OMTX505) o en combinación con gemcitabina (OMTX505: GEM); **(B)** conjugados TAM471 (OMTX705-471) frente a TAM551 (OMTX705-551); **(C)** conjugados TAM471 (OMTX705-471) y TAM553 (OMTX705-553) frente aTAM558 (OMTX705-558). Vehículo y GEM (Gemcitabina): grupos de control negativo y positivo.

Descripción detallada de la invención

En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan tal como se indica a continuación.

Endoglina

Tal como se usa, "endoglina" puede ser una proteína de endoglina de cualquier especie de mamífero. En algunos casos, la endoglina es la endoglina humana (también conocida como CD105, ENG o END), cuya secuencia de aminoácidos se desvela en el N.º de registro de UniProt P17813 (Versión 154, con fecha de 13 de noviembre de 2013) (SEQ ID NO: 27). En algunos casos, una molécula que se une a la endoglina (por ejemplo, una molécula de anticuerpo o un conjugado del mismo) se puede unir a una región del dominio extracelular de endoglina. El dominio extracelular de la endoglina humana comprende los restos 26-561 de la proteína de endoglina humana de longitud completa. En algunos casos, la endoglina es la endoglina de murino (también conocida como CD105, antígeno MJ7/18, ENG o END), cuya secuencia de aminoácidos se desvela en el N.º de registro de UniProt Q63961 (Versión 104, con fecha de 13 de noviembre de 2013) (SEQ ID NO: 28). El dominio extracelular de la endoglina de murino comprende los restos 27-581 de la proteína de endoglina de murino de longitud completa.

Conjugado

Tal como se usa en el presente documento, "conjugado" incluye la estructura resultante formada mediante el enlace de moléculas, e incluye específicamente conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) e inmunotoxinas (IT).

Se une selectivamente

Las expresiones se une selectivamente y unión selectiva se refieren a la unión de un anticuerpo o la unión de un fragmento del mismo, para una molécula predeterminada (por ejemplo, un antígeno) de una manera específica. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo, se puede unir a la endoglina, por ejemplo, una porción extracelular de la misma, con una afinidad de al menos aproximadamente $1x10^{7}M^{-1}$, y se puede unir a la molécula predeterminada con una afinidad que es al menos dos veces mayor (por ejemplo, cinco veces o diez veces mayor) que su afinidad por la unión a una molécula que no sea la molécula predeterminada.

Molécula de anticuerpo

Tal como se usa en el presente documento con respecto a todos los aspectos de la invención, el término "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo" incluye cualquier inmunoglobulina, bien natural o producida de forma sintética parcialmente o por completo. El término "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales (mAb) y anticuerpos policlonales (incluyendo antisueros policlonales). Los anticuerpos pueden estar intactos o ser fragmentos derivados de anticuerpos completos (véase a continuación). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos de origen no humano. "Anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos altamente específicos dirigidos frente a un único sitio antigénico o "determinante" de la molécula diana. Los "anticuerpos policlonales" incluyen las poblaciones heterogéneas de anticuerpos que se dirigen frente a diferentes determinantes antigénicos de la molécula diana. El término "antisuero" o "antisueros" se refiere a suero sanguíneo que contiene anticuerpos obtenidos de animales inmunizados.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Por lo tanto, la referencia a anticuerpos en el presente documento y con referencia a los métodos, conjuntos y kits de la invención, abarca un anticuerpo completo y también abarca cualquier polipéptido o proteína que comprende un fragmento de unión de anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios V_Hy C_H1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb que consiste en un dominio V_H; (v) las regiones CDR aisladas; (vi) los fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio V_H y un dominio V_L están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno; (viii) dímeros Fv de cadena simple (WO 93/11161) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (WO94/13804; 58). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL. También se pueden preparar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3.

En relación con una molécula de anticuerpo, La expresión "se une de manera selectiva" se puede usar en el presente documento para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no presentará ninguna unión significativa a otras moléculas que no sean sus miembros de unión específica. La expresión también se puede aplicar cuando, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno es específico para un epítopo particular que lo llevan una serie de antígenos, en cuyo caso, el miembro de unión específica que lleva el sitio de unión a antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que llevan el epítopo.

En algunos casos, de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo puede ser un anticuerpo completamente humano.

Agentes quimioterapéuticos citotóxicos

En algunos casos, de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención, el conjugado anticuerpo-fármaco de la invención se puede administrar con, o para la administración con, (bien de manera simultánea, secuencial o por separado) otros fármacos antitumorales, incluyendo, pero sin limitación, un agente quimioterapéutico citotóxico o un agente antiangiogénico o un agente inmunoterapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos son bien conocidos en la materia e incluyen agentes anticancerígenos tales como:

Agentes alquilantes que incluyen mostazas de nitrógeno tales como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucil; 10 etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina, tiotepa; sulfonatos de alquilo tales como busulfán; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNLJ), semustina (metil-CCN-U) y estreptozoeina (estreptozotocina); y
triacenos tales como decarbazina (DTIC;
dimetiltriazenoimidazolcarboxamida);
Antimetabolitos que incluyen análogos de ácido fólico tales como metotrexato (ametopterin); análogos de pirimidina tales como fluorouracil (5-fluorouracil; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) y citarabina (citosina arabinósido); y análogos de purina e inhibidores relacionados tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicofonnicina). Productos naturales incluyendo alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorabicina (daunomicina; rubidomicina), doxorrubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina Q; enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como alfenomas de interferón. Agentes misceláneos que incluyen complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino; antracenediona tal como mitoxantrona y antbraciclina; urea sustituida tal como hidroxiurea; derivado de metil hidrazina tal como procarbazina (N-metilhidrazina, MIH); un supresor adrenocortical tal como mitotano (o, p'-DDD) y aminoglutetimida; taxol y análogos/derivados; y agonistas/antagonistas hormonales tales como flutamida y tamoxifeno. Un agente citotóxico adicional preferido es Gemcitabine (Gemzar®). Un agente citotóxico adicional preferido es Paclitaxel unido a albúmina sérica humana (Abraxane®).

Los agentes antiangiogénicos son bien conocidos en la materia e incluyen agentes anticancerígenos tales como bevacizumab, itraconazol y carboxiamidotriazol.

Los agentes inmunoterapéuticos son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) y anticuerpos anti-muerte programada-ligando 1 (PD-L1), incluyendo Nivolumab (MDX1106) y Pembrolizumab (MK-3475).

Composiciones farmacéuticas

Los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención pueden estar comprendidos en composiciones farmacéuticas con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un compuesto o una combinación de compuestos que entra en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, la facilitación de la administración del conjugado anticuerpo-fármaco, un aumento en su duración y/o en su eficacia en el cuerpo o un aumento en su solubilidad en solución. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por el experto en la materia en función del modo de administración del conjugado de anticuerpo-fármaco.

En algunas realizaciones, los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención se pueden proporcionar en una forma liofilizada para la reconstitución antes de la administración. Por ejemplo, los conjugados anticuerpo-fármaco liofilizados se pueden reconstituir en agua estéril y mezclar con solución salina antes de la administración a un individuo.

Los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención generalmente se administrarán en la forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del conjugado anticuerpo-

fármaco. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además del conjugado anticuerpo-fármaco, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, un tampón, un estabilizador u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del conjugado anticuerpo-fármaco. La naturaleza precisa del transportador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser por bolo, infusión, inyección o cualquier otra vía adecuada, tal como se analiza a continuación.

Para la administración intravenosa, por ejemplo, mediante inyección, la composición farmacéutica que comprende el conjugado anticuerpo-fármaco puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable sin pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Los conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos se pueden emplear como se requiera incluyendo tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Sujeto

El sujeto puede ser un ser humano, un animal de compañía (por ejemplo, un perro o gato), un animal de laboratorio (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un cerdo o un primate no humano), un animal doméstico o de granja (por ejemplo, un cerdo, una vaca, un caballo o una oveja). Preferentemente, el sujeto es un ser humano. En algunos casos, el sujeto puede ser un ser humano diagnosticado de o clasificado como que está en riesgo de desarrollar un cáncer, por ejemplo, un tumor epitelial, un tumor sólido o una neoplasia sanguínea. En determinados casos, el sujeto puede ser un animal de laboratorio, por ejemplo, un modelo de ratón de un cáncer. En determinados casos, el sujeto puede ser un mamífero (por ejemplo, un ser humano) al que han diagnosticado de o clasificado como que está en riesgo de desarrollar una afección inflamatoria, tal como artrosis o artritis reumatoide (AR). En particular, el sujeto puede ser un ser humano que tiene artrosis o AR. En determinados casos, el sujeto puede ser un mamífero (por ejemplo, un ser humano) al que han diagnosticado de o clasificado como que está en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular, tal como retinopatía diabética o degeneración macular.

Cáncer

Los conjugados anticuerpo anti-ENG - fármaco descritos en el presente documento encuentran su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto mamífero. El tumor puede ser un tumor sólido. En particular, el cáncer puede ser un cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de vejiga o cáncer de colon.

Afección inflamatoria

En algunos casos de acuerdo con la presente invención, el conjugado anticuerpo-fármaco de la invención puede ser para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria. Se ha documentado la expresión de ENG en artrosis y en artritis reumatoide. Véase, por ejemplo, Szekanecz, Z. et al. Clinical Immunology and Immunopathology, 1995, 76, 187-194, y Leask A et al., Arthritis & Rheumatism, 2002, 46, 1857-1865. Los presentes inventores creen que los conjugados anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento, son capaces de mejorar la artrosis, la artritis reumatoide y/o los síntomas de artrosis o de artritis reumatoide.

Enfermedad ocular

En algunos casos de acuerdo con la presente invención, el conjugado anticuerpo-fármaco de la invención puede ser para su uso en el tratamiento de una enfermedad ocular (por ejemplo, retinopatía diabética o degeneración macular, tal como degeneración macular relacionada con la edad). Se ha documentado la expresión de ENG en determinadas afecciones oculares, incluyendo la degeneración macular y la retinopatía. Véase, por ejemplo, Tsutomu Yasukawa *et al*., Curr Eye Res. 2000, 21, 952-961 y Abu El-Asrar AM *et al*., Mediators Inflamm. 2012,2012:697489, y Malik RA *et al., J Cell Mol Med.* 2005, 9:692-7. Los presentes inventores creen que los conjugados anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento, son capaces de mejorar las enfermedades oculares y/o los síntomas de las mismas (incluyendo la retinopatía diabética o la degeneración macular, tal como degeneración macular relacionada con la edad). Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1- Producción de anticuerpos anti-ENG

Los scFv anti-ENG de las bibliotecas de fago de anticuerpo sintético se han descrito anteriormente *(29)*. Un scFv, dirigido frente a la región extracelular de la ENG humana, conocido como "A5" *(29)* y un scFv, dirigido frente a la región extracelular de la ENG de murino, conocido como "mE12" *(31)* se convirtieron en IgG de longitud completa para los posteriores estudios de caracterización y para la generación de inmunotoxinas y CAF. Todos los scFv se produjeron en *E. coli* y se purificaron mediante IMAC, las IgG se produjeron en células de mamífero (CHO) usando los vectores de expresión de Lonza GS pEE6.4 y pEE14.4 desarrollados para la producción de anticuerpos. Las características del material de partida de scFv se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: anticuerpos, especificidades, subclases y vectores usados como material de partida

Formato	***Especie***	***Antígeno***	***Clon***	***Subclase V1***	***Vector***	***N.º de plásmido de ADN***
scFv	*humano*	*ENG humana*	*A5*	*kappa*	*pAB1*	*179*
scFv	*humano*	*ENG de ratón*	*mE12*	*lambda*	*pAB1*	*151.1*

Todos los scFv se produjeron de forma bacteriana en *E. coli* TG1 y se purificaron a partir de los extractos periplásmicos de cultivos de 1L mediante IMAC.

Los plásmidos que se corresponden con los anticuerpos de IgG1 de longitud completa se generaron y se transfectaron en células CHO para la producción de anticuerpos en el sistema de expresión en CHO de Lonza con rendimientos de aproximadamente 1 mg/l de cultivo celular (a escala de laboratorio). Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo celular mediante cromatografía de proteína A. Las proteínas purificadas se caracterizaron mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión de tamaño. La bioactividad se analizó mediante ELISA usando la ENG recombinante y la detección de los anticuerpos unidos con anticuerpos anti-IgG humana conjugada con HRP. La unión celular se analizó mediante citometría de flujo usando la célula B16 de ratón que expresa ENG.

Resultados:

Plásmidos generados (y secuenciados):

A5 IgG1:	pEE14.4 A5-IgG1	OCMTX003p	(IgG1 humana anti-huENG)
mE12 IgG1:	pEE14.4 mE12-IgG1	OCMTOO4p	(IgG1 humana anti-muENG)

Ejemplo 2 - Caracterización de anticuerpos anti-ENG

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (HC, del inglés *heavy chain*) y de la cadena ligera (LC, del inglés *light chain*) de la IgG1 anti-ENG humana A5 (A5-IgG1), respectivamente se muestran a continuación:

A5-IgG1-HC anti-endoglina humana:

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AIYGSDGDTTY**ADSVKGRF

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**VFYTAGFDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST

SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN

HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP***PVA***GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK***G***LP***SS***IEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS

KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

aa	*447*
PM de la HC procesada	*48.703*
pI teórico	*8,36*
Posible sitio de glucosilación (doble subrayado):	*N297*

Las mutaciones que llevan a una deficiencia en CCDA y CDC se muestran en negrita y en cursiva (véase también el

documento WO 99/58572)
La secuencia de la señal se muestra recuadrada
El dominio VH está subrayado; CDRH1-H3 se muestran en negrita y subrayado curvo.

A5-IgG1-LC anti-endoglina humana:

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

DIELTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSSLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQAPAKPPT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

aa	*214*
PM de la HC procesada	*23.113*
pI teórico	*7,76*

la secuencia de la señal está recuadrada

el dominio VL está subrayado; CDRL1-L3 se muestran en negrita y subrayado curvo.

A5-IgG1-HC - sin secuencia señal:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AIYGSDGDTTY**ADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**VFYTAGFDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP***PVA***GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK***G***LP***SS***IEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

A5-IgG1-LC - sin secuencia señal:

DIELTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSSLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQAPAKPPT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)

A5-VH:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPGKGLEWVS**AIYGSDGDTTY**ADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**VFYTAGFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 5)

A5-VL:

DIELTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSSLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQAPAKPPT**FGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 6)

A5-CDRH1:
SYAMS (SEQ ID NO: 7)
A5-CDRH2:

AIYGSDGDTTY (SEQ ID NO: 8)
A5-CDRH3:
VFYTAGFDY (SEQ ID NO: 9)
A5-CDRL1:
RASQSISSSLN (SEQ ID NO: 10)
A5-CDRL2:
AASSLQS (SEQ ID NO: 11)
A5-CDRL3:
QQAPAKPPT (SEQ ID NO: 12)
Los parámetros del A5-IgG completo son tal como sigue:

Longitud total de la IgG de longitud completa (aa):	*1.322*
Masa molecular calculada de la IgG de longitud completa:	*143.577*
Coeficiente de extinción calculado de la IgG de longitud completa:	*195.440*
Abs al 0,1 % (=1 g/l)	*1,361*
pI teórico:	*8,36*
posible sitio de glucosilación:	*N297*

mE12-IgG1-HC anti-endoglina de murino:

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGKGLVWVS**RINSDGSSTSYADSVKG**RF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ATGTWVMS**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP***PVA***GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK***G***LP***SS***IEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)

aa	*446*
PM de la HC procesada	*48.574*
pI calculado	*8,88*
Posible sitio de glucosilación (doble subrayado):	*N297*

Las mutaciones que llevan a una deficiencia en CCDA y CDC se muestran en negrita y en cursiva
La secuencia de la señal se muestra recuadrada
El dominio VH está subrayado

mE12-IgG1-LC anti-endoglina de murino:

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
SSELIQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGN
TASLTITGAQAEDEADYYC**NSRDSSGTV**FGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLI
SDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK
TVAPTECS (SEQ ID NO: 14)

aa	*212*
PM (procesado)	*22.516*
pI calculado	*6,69*

La secuencia de la señal se muestra recuadrada
el dominio VL está subrayado

mE12-IgG1-HC - sin secuencia señal:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGKGLVWVS**RINSDGSSTSYADSVKG**RF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ATGTWVMS**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP***PVA***GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK***G***LP***SS***IEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)

mE12-IgG1-LC - sin secuencia señal:

SSELIQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGN
TASLTITGAQAEDEADYYC**NSRDSSGTV**FGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLI
SDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK
TVAPTECS (SEQ ID NO: 16)

mE12-VH:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGKGLVWVS**RINSDGSSTSYADSVKG**RF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**ATGTWVMS**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 17)

mE12-VL:

SSELIQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQKPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGN
TASLTITGAQAEDEADYYC**NSRDSSGTV**FGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 18)

mE12-CDRH1:
SYGMH (SEQ ID NO: 19)

mE12-CDRH2:
RINSDGSSTSYADSVKG (SEQ ID NO: 20)

mE12-CDRH3:
ATGTWVMS (SEQ ID NO: 21)

mE12-CDRL1:
QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO: 22)

mE12-CDRL2:
GKNNRPS (SEQ ID NO: 23)

mE12-CDRL3:
NSRDSSGTV (SEQ ID NO: 24)

Los anticuerpos purificados anti-muENG mE12 y anti-huENG A5 se analizaron en ELISA para la unión a ENG recombinante y usando el análisis de citometría de flujo (FACS). Se muestran los resultados de afinidad para las IgG1 mE12 anti-muENG (Figuras 1 y 2) y A5 anti-huENG (Figura 3), y se resumen en la Tabla 2. La Figura 1 muestra la unión dependiente de la concentración de mE12-IgG a la ENG recombinante de ratón (aa 27-581), pero no al control negativo (BSA). La Figura 2 muestra el análisis de la citometría de flujo de la unión de mE12-IgG a a) células B16 usando 50 µg/ml de anticuerpo, b) células B16 usando 5 µg/ml de anticuerpo y c) células HT1080 incluidas como control negativo. La Figura 3 demuestra la unión dependiente de la concentración de A5-IgG a la ENG humana mediante a) ELISA y b) análisis de citometría de flujo.
Para la ampliación, las construcciones de anticuerpos se clonaron en vectores dobles de GS (pEE14.4). Los plásmidos

de ADN se transformaron, se amplificaron y se transfectaron de manera transitoria en células CHOK1SV para la evaluación de la expresión a un volumen de 200 ml. En una segunda etapa, los anticuerpos se expresaron de manera transitoria en cultivos a gran escala de 5-10 l. El sobrenadante de cultivo aclarado se purificó usando la cromatografía de proteína A de una etapa. El análisis de calidad del producto mediante SE-HPLC, SDS-PAGE y LAL se llevó a cabo usando material purificado a una concentración de 1 mg/ml, junto a un anticuerpo humano interno como una muestra de control.

Las muestras de proteína purificadas se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y se analizaron mediante cromatogramas de SE-HPLC. La mE12-IgG se purificó a >98,8 %. La A5-IgG se purificó a >90 %. Los niveles de endotoxina fueron < 0,5 UE/mg.
Todas las proteínas purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (datos no mostrados).

Las proteínas purificadas A5-IgG y mE12-IgG se caracterizaron mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión de tamaño. La bioactividad se analizó mediante ELISA, usando la ENG recombinante de ratón/humano y la detección de los anticuerpos unidos con anticuerpos anti-IgG humana conjugada con HRP. La unión celular se analizó mediante citometría de flujo, usando HT1080 positivo en ENG y eEnd2 de ratón que expresan ENG. Los puntos de fusión se determinaron mediante dispersión de luz dinámica usando un zetasizer nano. Las afinidades se determinaron mediante QCM usando un Attana A100. El estudio de internalización se realizó mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia indirecta en células permeabilizadas, detectando los anticuerpos unidos e internalizados con un anticuerpo secundario marcado con FITC.

Los anticuerpos purificados IgG1 de longitud completa se produjeron con éxito tanto a escala de laboratorio como a gran escala, para la generación de inmunoconjugados. Un resumen de las propiedades del anticuerpo se muestra en la Tabla 2. Los anticuerpos conservaron su especificidad, tal como se muestra mediante ELISA y los experimentos de citometría de flujo. Las afinidades, tal como se determina mediante QCM, fueron comparables con las de los anticuerpos parentales. Las mediciones de QCM indicaron la contribución de los efectos de avidez a la unión de alta afinidad. La estabilidad térmica difirió entre las diferentes IgG (64-72 °C).

Los estudios de internalización preliminares indican una rápida internalización celular para A5-IgG rente a células que expresan la ENG humana. De hecho, en 30 minutos, casi el 90 % de la A5-IgG se encuentra en las células HT1080.

Tabla 2: Resumen de las propiedades de los anticuerpos

anticuerpo	***A5-IgG1***	***mE12-IgG1***
antígeno	*humano*	*ratón*
	endoglina	*endoglina*
isotipo	*γ1* / κ*	*γ1* / λ*
Tipo de IgG	*humano*	*humano*
plásmido	*OCMTX003p*	*OCMTX004p*
pureza (SEC)	*agregados menores*	√
Tm (DLS)	*72 °C*	*64 °C*
ELISA CE_{50}	*0,3 nM (rhENG)*	*60 nM (rmENG)*
FACS CE_{50}	*0,4 nM (HT1080)*	*89 nM (eEnd2)*
constantes de unión de K_D (QCM)	*rhENG: K_D1 = 260 nM K_D2 = 2,5 nM*	*n.d.*
internalización	*HT1080 30~60min*	*n.d.*
γ1 = deficiente para CCDA y CDC (véase Amour et al., 1999; Richter et al., 2013).*		

La Figura 9 muestra la internalización de la IgG1 anti-huENG A5.

Ejemplo comparativo 3 - cadena A de Nigrina b

Con el fin de evitar los efectos secundarios de la toxina libre que se podría liberar en el torrente sanguíneo y para reducir la posible inmunogenicidad de la toxina RIP, tal como se describe ampliamente con la ricina, el dominio enzimático de la nigrina b, la cadena A, se clonó y se expresó en las bacterias. Los presentes inventores hipotetizaron que, si la cadena A producida en las bacterias era capaz de conservar su actividad, no sería capaz de entrar en las células, salvo que se conjugue con una molécula de vehículo, tal como un anticuerpo.

Producción

La cadena A de la nigrina b se sintetizó teniendo en cuenta la optimización por codón para la expresión de bacterias y el gen sintetizado se clonó en dos vectores diferentes, Nigrin_pET30b-3 y Nigrin_pET33b-1 (marcaje de His +/-) para la expresión en dos cepas diferentes de *E. coli*, *E. coli* BLR(DE3) y *E. coli* HMS174(DE3). Se usaron diferentes medios de cultivo para comprobar las diferentes condiciones de expresión. El proceso de purificación se estableció usando la cromatografía Capto Q y SP de Sefarosa de alto rendimiento. La cadena A de la nigrina b recombinante purificada (recNgA) se formuló a 5 mg/ml en PBS 1X a pH 7,4, DTT 0,5 mM, glicerol al 10 %. Los niveles de endotoxina fueron <1UE/mg de nigrina y la pureza fue de > 99 % en forma monomérica.

La secuenciación de N-terminal de Eldman reveló que el extremo N-terminal de recNgA se correspondió con la secuencia esperada.

Secuencia de aminoácidos de cadena A de nigrina b recombinante:

MIDYPSVSFNLDGAKSATYRDFLSNLRKTVATGTYEVNGLPVLRRESEVQVKSRFVLVPLTNYNGNTV
TLAVDVTNLYVVAFSGNANSYFFKDATEVQKSNLFVGTKQNTLSFTGNYDNLETAANTRRESIELGPS
PLDGAITSLYHGDSVARSLLVVIQMVSEAARFRYIEQEVRRSLQQATSFTPNALMLSMENNWSSMSLE
IQQAGNNVSPFFGTVQLLNYDHTHRLVDNFEELYKITGIAILLFRCSSPSND (SEQ ID NO: 25)

La cadena A de nigrina b recombinante tiene las siguientes características:

Número de aminoácidos: 256
Peso molecular: 28546,0
pI teórico: 5,45

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena A de nigrina b es tal como sigue:

atagactatc cctccgtctc cttcaacttg gatggagcca agtcggctac atacagggac
ttcctcagca acctgcgaaa aacagtggca actggcacct atgaagtaaa cggtttacca
gtactgaggc gcgaaagtga agtacaggtc aagagtcggt tcgttctcgt ccctctcacc
aattacaatg gaaacaccgt cacgttggca gtagatgtga ccaaccttta cgtggtggct
tttagtggaa atgcaaactc ctacttttc aaggacgcta cggaagttca aaagagtaat
ttattcgttg gcaccaagca aaatacgtta tccttcacgg gtaattatga caaccttgag
actgcggcga atactaggag ggagtctatc gaactgggac ccagtccgct agatggagcc
attacaagtt tgtatcatgg tgatagcgta gcccgatctc tccttgtggt aattcagatg
gtctcggaag cggcaaggtt cagatacatt gagcaagaag tgcgccgaag cctacagcag
gctacaagct tcacaccaaa tgctttgatg ctgagcatgg agaacaactg gtcgtctatg
tccttggaga tccagcaggc gggaaataat gtatcaccct tctttgggac cgttcagctt
ctaaattacg atcacactca ccgcctagtt gacaactttg aggaactcta taagattacg
gggatagcaa ttcttctctt ccgttgctcc tcaccaagca atgat (SEQ ID NO: 26)

Materiales

- Construcción genética de Nigrina pET30b-3.
- *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Palmers BLR(DE3)
- Medios de cultivo: medio autoinducido (AIM, del inglés *auto induced medium*)
- Tampón de cultivo de extracción: Glicina/NaOH 10 mM, Leupeptina 1 µg/ml, Pepstatina 1 µg/ml, pH 9,5.
- Tampón de sobrenadante de extracción Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, MgCl2 2 mM, leupeptina 1 μgml^{-1}, pepstatina 1 μgml^{-1}, lisozima 0,1 $mgml^{-1}$, pH 8,0.
- Solución de diálisis: Ácido cítrico/NaOH 25 mM a pH 5,0. -Capto Q FPLC: Tampón de equilibrado A: Glicina/NaOH 50 mM a pH 9,5. Tampón de elución B: Glicina/NaOH 50 mM a pH 9,5, NaCl 1 M.
- Fracciones agrupadas de la etapa de Capto Q (+ 80 ml de extracción).
- SP Sefarosa HP FPLC: Tampón de equilibrado A: Ácido cítrico 25 mM a pH 4,0. Tampón de elución B: Ácido cítrico

25 mM a pH 4,0, NaCl 1 M.

Métodos

E. coli BLR (DE3) que mantiene la expresión de Nigrina pET30b-3 cultivada en 1 litro de formato de medio autoinducible (AIM) con 30 $\mu g \cdot ml^{-1}$ de Kanamicina. La expresión de la proteína se desencadenó mediante la activación de la lactosa y el agotamiento de la glucosa después de aproximadamente 3-4 horas de crecimiento. Después, la temperatura se redujo a 20 °C durante una duración de toda la noche.

Para la extracción, cada sedimento celular se resuspendió inicialmente en 80 ml de tampón de extracción por litro de cultivo, y se realizaron 3 ciclos de desintegración de 7 minutos a 1100-110 Bar tras 30 minutos de incubación a 8 °C bajo agitación. Después se sometió el extracto a 60 minutos de centrifugación a 15.900 g, a 8 °C. El sobrenadante fue el material de partida de la purificación.

Capto Q FPLC: 160 ml de producto extraído del cultivo 81 se cargaron en 160 ml de Capto Q y se equilibraron usando 4CV de tampón de equilibrado y se lavó con 15CV de tampón de equilibrado. La elución se llevó a cabo en tres etapas: 15CV a 1,5mS/cm (7,6 %B); 20CV a 23,8 mS/cm (18,9 %B); 20CV 100 %B.

La diálisis se realizó en las siguientes condiciones: se sometieron a diálisis 650 ml del producto en 4x5l baños en ácido cítrico/NaOH 25 mM a pH 5,0, valor de corte 6-8000Da. Factor de diálisis ~ 3500, <24 h. Tras la diálisis, una centrifugación de 30 minutos a 20.500 g y a 8 °C permitió separar la fracción soluble de la insoluble. Se realizó el SDS-PAGE sobre el total y las fracciones solubles tanto antes como después de la diálisis (10 µl cargado en SDS-PAGE). El eluyente se sometió a diálisis en PBS a pH 7,4 y se filtró a φ=0,22 µm usando filtros de $2x20cm^2$ EKV.

SP Sefarosa HP: Se cargaron 610 ml de mezcla dializada de Capto Q en ácido cítrico 25 mM a pH 5,0 en 240 ml de SP Sefarosa de alto rendimiento con 4CV de tampón de equilibrado y se lavó con 15CV de tampón de equilibrado y se eluyó a un gradiente de 25Cv al 20 % de B; etapa de 4CV del 100 % de B.

Las fracciones mezcladas de la etapa de SP Sefarosa HP se sometieron a diálisis en PBS a pH 7,4, DTT 0,5 mM (5x4l baños, fracciones agrupadas de 950 ml a 0,97 mg/ml). El valor de corte fue 6-8000 Da, el factor de diálisis fue de ~3130, tiempo > 24 h. Después, una centrifugación de 30 min a 20,55 g y 8 °C permitió separar la fracción soluble de la insoluble. Después se añadió glicerol al 10 %.

Finalmente se sometió a diálisis al eluyente en PBS a pH 7,4 (5 baños ~3100) y se filtró a φ=0,2 µm, después, el lote recNg b A se congeló de manera instantánea a -80 °C. Más tarde, se llevó a cabo un SEC en un Semi-Preparative S200 Superdex.

La cromatografía de exclusión por tamaño y el análisis de espectrometría de masas demostró el estado monomérico y de purificación de la cadena A de nigrina b recombinante obtenida (recNgA) (Figura 4).

Se realizaron estudios de estabilidad para evaluar el efecto del pH y de la temperatura sobre la propia proteína de cadena A de nigrina b y su actividad. La recNgA es estable a un pH que varía de 5 a 9, y en presencia o no de glicerol (del 10 al 45 %) (datos no mostrados).

Actividad

Se evaluó la actividad de la proteína inactivadora del ribosoma (RIP, del inglés *ribosome-inactivating protein*) de la cadena A de nigrina b en lisado sin células de los reticulocitos de conejo: el valor de CI50 obtenido fue similar a la nigrina b natural y en un intervalo de 2,5 a 25 pM (véase la Figura 5). Por tanto, la cadena A de nigrina b, expresado como una proteína recombinante en bacterias, mantiene su actividad enzimática, sosteniendo que la glucosilación no se requiere para la actividad de RIP de la cadena A de la nigrina b.

RecNgA conserva su actividad en lisados sin células de reticulocitos de conejo si se almacena congelado a (-80 °C) y por debajo de 3 ciclos de congelación descongelación (no mostrado).

La actividad citotóxica de recNgA se ensayó en cultivos celulares a través de un ensayo de viabilidad basado en cristal violeta. recNgA, que carece de la cadena B para la translocación en células, presenta una actividad de 100 a 1000 menos tóxica que la nigrina b natural, tal como se muestra en la Figura 6. La nigrina b natural presentó una $CI_{50} \approx 2x10^{-8}M$ (similar a los datos publicados previamente, véase 37), mientras que recNgA mostró una $CI_{50} \approx 2x10^{-6}M$.

Los estudios publicados previamente mostraron que la nigrina b natural presenta una mayor actividad de RIP que la ricina en el ensayo de RRL, mientras que es mucho menos tóxico (30-10.000 veces, aproximadamente) en células o *in vivo* (véanse los valores de CI50 y DL50 en la Tabla 3).

Al retirar la cadena B, la cadena A de ricina pierde actividad tanto en el ensayo de RRL como en el ensayo de citotoxicidad. Inesperadamente, la cadena A de la nigrina b, generada por primera vez en esta presente invención, solo pierde actividad en el ensayo de citotoxicidad celular, mientras que incluso aumentó en el ensayo de RRL con respecto a la Nigrina b natural. Estos datos sugerían que, en el caso de la ricina, la retirada de la cadena B estaba afectando no solo a la unión y a la translocación de la cadena A, sino también a su actividad de RIP, aunque este no fue el caso para la cadena A de la nigrina b, que conserva e incluso aumenta su actividad de RRL con respecto a su contraparte natural. Como resultado, la cadena A de la nigrina b es 50 veces más activa que la cadena A de la ricina en RRL.

Por consiguiente, tras la conjugación, los conjugación, los conjugados anticuerpo de cadena A de la nigrina b - fármaco presentan una mayor actividad citotóxica (CI50 en un intervalo de pM) que los conjugados de anticuerpo de cadena A de la ricina - conjugados de los fármacos (intervalo de nM)(no mostrado).

Tabla 3: Datos de actividad *in vitro* e *in vivo* para la ricina y la nigrina b (natural y cadena A).

	Lisado de conejo CI_{50} (pM)	**CI_{50} de células HeLa (pM)**	**DL_{50} de ratón (μgkg^{-1})**
Nigrina b	30	27.600,00 (20-2300 nM; línea celular dpt)	12.000,00
Cadena A de la nigrina b	6,5	750.000,00 (HT1080-FAP) 300.000,00 (HT1080)	ND
Ricina	100	0,67	3,00
Cadena A de ricina	500	260.000,00 (linfocitos T)	ND

(Datos propios de los inventores de la cadena de nigrina b de la cadena A; véase también Ferreras J.M. et al., Toxins, 3:420, 2011; Svinth M. et al., BBRC, 249: 637, 1998)

Ejemplo comparativo 4 - Conjugación de la cadena A de la nigrina b con anticuerpos anti-ENG

Para los inmunoconjugados que contienen RIP para presentar una citotoxicidad máxima, la RIP se debe liberar desde el vehículo de direccionamiento en forma completamente activa, que requiere evitar el impedimento estérico (38). El enlace disulfuro es el único tipo de enlace que se ajusta a este criterio (39, 40). Esta unión permite la conjugación usando reactivos para la introducción de grupos sulfhidrilo libres tales como N-succinimidil 3(2-piridil-ditiopropionato) (SPDP) y 4-succinimidiloxicarbonil-α-metil-α (2-piridil-ditio)tolueno (SMPT). Las inmunotoxinas que consisten en mAb unidos de manera covalente a toxinas mediante enlazadores disulfuro impedidos, a menudo etiquetados como inmunotoxinas de segunda generación, son estables, de larga duración y presentan una potente citotoxicidad para las células diana (41).

El SPDP ya se ha usado en la preparación de las inmunotoxinas (IT) que contienen nigrina b (36, 42). Además, el SMPT protege el enlace disulfuro del ataque por aniones tiolato, mejorando la estabilidad *in vivo* del enlace (43, 44).

Material

- Cadena A de nigrina b recombinante en PBS, a pH 7,4, con glicerol al 10 %, DTT 0,5 mM, 4,92 gl^{-1}, almacenado a 5 °C.
- 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico)
- Columnas desaladoras GE PD MiniTrap G-10.
- Filtros Minisart estériles de 0,2 µm y 28 mm.
- Estación de trabajo Sciclone ALH 3000.
- Placa de Sarstedt Microtest de 96 pocillos, de fondo plano, n° de ref 82.1581.

Métodos

El ditiotreitol (DTT, reactivo de Cleland) es un agente redox que se usará para liberar los grupos tiol presentes en la muestra de proteína. Una vez que se han liberado dichos grupos y, por lo tanto, están disponibles para reaccionar, se añadirá 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (reactivo de Ellman). El puente disulfuro del reactivo de Ellman se escindirá y las 2 moléculas resultantes de tio-nitrobenzoato (TNB) atacarán a la proteína en los sitios del grupo tiol. Para titular las TNB, se tomarán valores de absorbancia a λ=412nm, una longitud de onda a la que no se absorbe DTT, representando la concentración de los grupos tiol. La proporción de esto con la concentración de la proteína tomada de su absorbancia a λ=280 producirá el número de grupos tiol libres por molécula de proteína.

La titulación de tiol directa se realizó tal como sigue:
se disolvieron 204 µl de A de recNg b en 796 µl de fosfato 20 mM, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM a pH 7,0 (tampón de ensayo) (1,0033 gl^{-1}=concentración final). El reactivo de Ellman se disolvió en fosfato 0,2 M a 3 gl^{-1}. Para ambos tampones, se añadieron fosfato de sodio monobásico y dibásico en una proporción de masa de 1,61 a 1. Se ajustó el pH a temperatura ambiente y se filtraron los tampones. Se prepararon 100 ml de tampón de Ellman y 500 ml de tampón

de ensayo. El reactivo de Ellman se resuspendió por completo en lugar de pesarse.
La muestra de recNgA se incubó en presencia de DTT 4,8 mM a temperatura ambiente durante 30 min. La muestra de recNgbA después se purificó en la columna, y se tomaron alícuotas de los 10 ml primeros del eluyente (V=0,5 ml). Se tomó la A_{280} de las alícuotas y se mezclaron las dos más concentradas. Se tomó de nuevo la A_{280}. Se añadieron 10 µl de 3 gl^{-1} de DTNB y se midió la A_{412} después de 2 min (n=1), usando Ellman diluido en tampón de ensayo en la misma concentración como un blanco (nb=3). Las lecturas pertenecían al intervalo lineal de 0,1-3 UA. Las soluciones de proteínas se pipetearon justo debajo del menisco después de agitar vorticialmente. Se pipetearon 100 µl por pocillo. Los resultados de este estudio muestran que el grupo tiol que pertenece al único resto de cisteína de recNgA está libre y disponible para la reacción, sin que esté bloqueado por su estructura terciaria. Esto permitirá que recNgbA se conjugue usando un enlazador que requiere un enlace disulfuro intercaternario impedido.

Está bien establecido que los inmunoconjugados que contienen proteínas de activación de ribosomas presentan la máxima citotoxicidad solo cuando la molécula de toxina se libera desde el vehículo de direccionamiento en una forma completamente activa. La separación de la molécula de RIP del vehículo se requiere para evitar el impedimento estérico y para permitir una translocación eficaz de la toxina al citoplasma *(38)*. Actualmente, el enlace disulfuro es el único tipo de enlace que parece que se ajusta a este criterio *(40)*.

El acoplamiento de las dos macromoléculas de proteína diferentes, que da como resultado la formación de heterodímeros, requiere que se modifique cada proteína antes de mezclarlas para que reaccionen. En el caso de las cadenas A de las RIP de tipo 2, la modificación se limita a la escisión reductiva del resto de cisteína natural que enlaza las cadenas activa (A) y de unión (B) de la molécula.

Para moléculas de IgG, esto no es posible, ya que los restos de cisteína están implicados en el mantenimiento de la estructura terciaria y/o cuaternaria de la proteína, de manera que no es posible reducirlos sin pérdida de las funciones específicas de la proteína. Por otra parte, presumiblemente, algunos de los restos de cisteína no son estéricamente accesibles, tal como se demostró mediante los 10 grupos tioles por inmunoglobulina que se tenían que generar para una conjugación óptima con una RIP activada *(45)*.

Por estas razones, en la mayoría de las moléculas de IgG, los grupos tiol se insertan químicamente usando reactivos heterobifuncionales, y se han desarrollado varios métodos con el fin de generar heteroconjugados que evitan o que reducen al mínimo la formación de homopolímeros. En la mayoría de los casos, los reactivos usados para introducir grupos tiol reaccionan con los grupos amino, formando enlaces amida o amidina. Los grupos amino son reactivos, abundantes y, en un modo limitado para la mayoría de las proteínas, reemplazables. Es decir, se puede modificar un número limitado de grupos amino sin reducir la actividad biológica de la proteína (40).
Los reactivos más comúnmente usados para la introducción de grupos sulfhidrilo libres son N-succinimidil 3(2-piridil-ditiopropionato) (SPDP) y 4-succinimidiloxicarbonil-α-metil-α (2-piridil-ditio)tolueno (SMPT), que introducen grupos 2-piridil disulfuro en la proteína haciéndolos reaccionar con los grupos amino para formar amidas neutras y metil 4-mercaptobutirimidato (2-iminotiolano. Reactivo de Traut) que introduce grupos mercaptobutirimidoil, que reaccionan para formar amidinas cargadas, conservando de este modo la carga positiva del aminoácido derivatizado (40;*44).*

SPDP y SMPT introducen un enlace disulfuro impedido, mientras que el -SH de 2-iminotiolano se debe proteger haciéndolo reaccionar con ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (reactivo de Ellman).
La reacción con el reactivo de Ellman también se usa para medir rápidamente los grupos sulfhidrilo de la proteína *(45, 46)*.

SMPT tiene un grupo metilo y un anillo de benceno unido al átomo de carbono adyacente al enlace disulfuro que lo protege del ataque por aniones de tiolato, mejorando por lo tanto la estabilidad *in vivo* del enlace *(43, 44).*

Según estos datos, las proteínas IgG se pueden modificar con SMPT, que no afecta de manera significativa a la propiedad de unión a antígeno de las moléculas en las siguientes condiciones, incluso si cambian la carga de la proteína en el sitio de la reacción.

En un estudio, los presentes inventores investigaron la conjugación de las IgG1 con recNgA, usando 2 proporciones molares de recNgA:mAb diferentes de 2,5 y 3,5, tras la derivatización, usando una proporción molar de SMPT:mAb de 6, tras los protocolos de conjugación (véase 40). La purificación se realizó mediante cromatografía por exclusión de tamaño en Sephacryl S200 (véase *41).*

En las condiciones descritas, la inmunotoxina es predominantemente una mezcla de anticuerpo enlazado a una o dos moléculas de toxina, con la presencia de componentes de alto peso molecular (IgG enlazada a varias proteínas RIP), así como RIP libres y poliméricas (diméricas en el caso de recNgA) y anticuerpos libres. Por tanto, se piensa que una purificación cuidadosa es deseable para obtener un producto puro.

Ensayo de actividad in vitro

El ensayo de actividad sobre conjugados preparados tal como se describe anteriormente se realizó a través de la evaluación de la actividad de RIP en el ensayo de lisado sin células de reticulocitos de conejo (RRL). Los resultados se presentan en la Figura 7.

Los valores de CI_{50} obtenidos para la nigrina b o la recNgA estaban en el intervalo de 2,5 pM y aquellos para los conjugados fueron similares y en el intervalo de 1-0,5 pM, incluso mayores que el control positivo de la nigrina b natural, demostrando que la conjugación de anticuerpo no afectó a la actividad enzimática de recNgA.

Ejemplo 5 - Conjugación de citolisinas con anticuerpos anti-ENG

Las citolisinas empleadas para los estudios de conjugación se eligieron de la estructura general mostrada anteriormente (fórmula IV). Estas estructuras presentan actividad frente a las diferentes líneas de células cancerosas (intervalo de nM a pM).

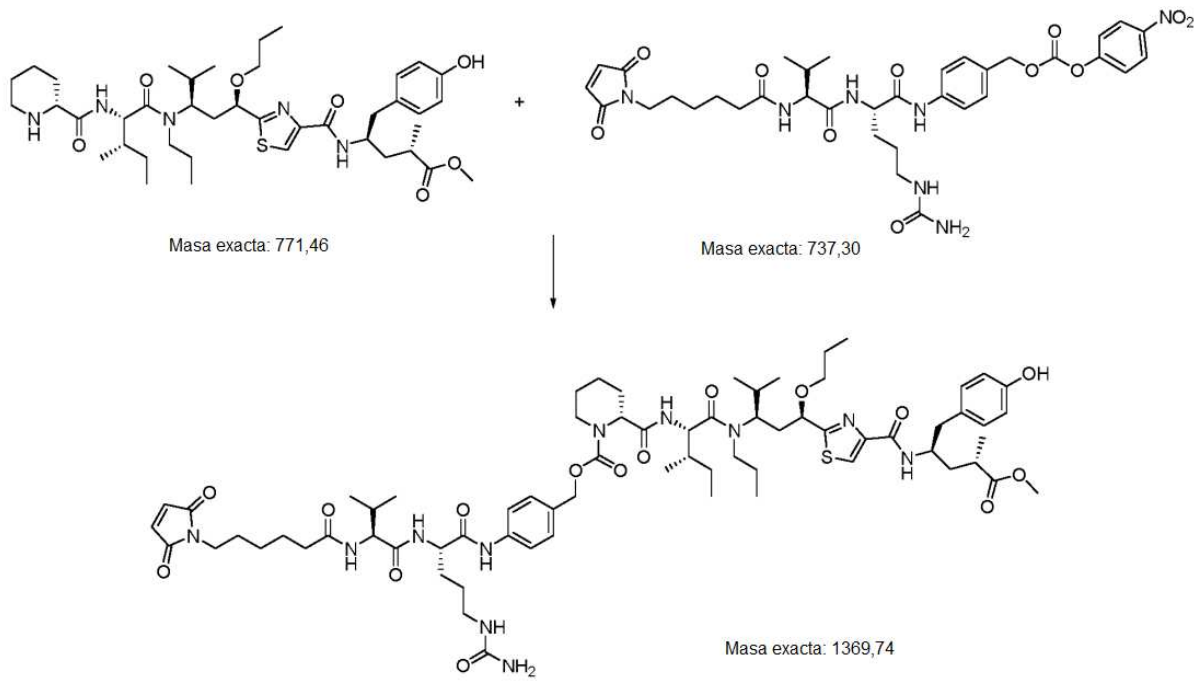
Se pueden usar diversos sistemas de enlazadores y unirlos bien a la posición R^2 o a la R^{17} de la molécula.

El esquema general de los conjugados de anticuerpo de citolisina-fármaco, incluyendo el enlazador de vcPABA y el anticuerpo anti-ENG, se muestra en la Figura 8 (en la estructura representada en la Figura 8, el sitio de unión de la citolisina al enlazador vcPABA es en la posición R_1 o R_4 - el sistema de numeración de R_1 y de R_4 usado en la Figura 11 difiere del sistema de numeración del grupo R usado, por ejemplo, en las reivindicaciones; se pretende que R_1 de la Figura 11 se corresponda con R^2 en las reivindicaciones y que R_4 de la Figura 11 se corresponda con R^{17} de las reivindicaciones).

El enlazador escindible de proteasa vcPABA (valina-citrulina-PABC) se ha usado previamente en la molécula de CAF Brentuximab Vedotina, desarrollada por Seattle Genetics y Takeda, y recientemente aprobada por la FDA y EMEA como Adcetris® (2011, y nov. 2012, respectivamente). En este CAF, el vcPABA se ha acoplado en su NH2 libre a maleimida caproil para la conjugación basada en tiol en mAb (anticuerpo anti-CD30 cAC10). Por otro lado, vcPABA se ha conjugado a través de su COOH con el fármaco citotóxico Auristatina de Seattle Genetics (MMAE). (véase 48)

Los presentes inventores han usado este enlazador (maleimida caproil-vcPABA) para conjugar anticuerpos anti-ENG a través de la reacción basada en tiol con maleimida caproil y, en el otro extremo, a las moléculas citotóxicas de citolisina a través de su piperidina cíclica con vcPABA (posiciones R_1 o R_4 de la citolisina mostradas en la Figura 8).

Síntesis de Maleimido-val-cit-PABOCO-Tubulisina/Citolisina-TAM461:

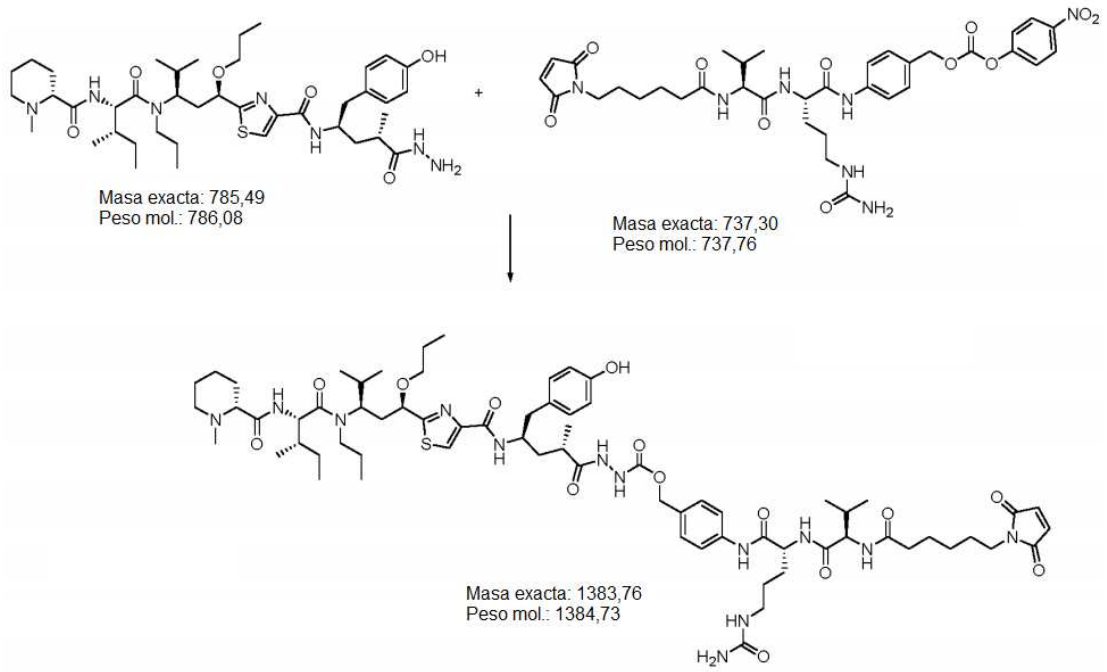


TAM467

TAM461 (Tubulisina/Citolisina):	30,0 mg (0,041 mmol)
DMF:	3 ml
TAM465 (Enlazador):	35 mg (0,045 mmol)
HOBt:	1,4 mg
DIPEA:	10 µl

TAM461 y **TAM465** se disolvieron en DMF anhidro en condiciones secas y la solución resultante se trató con HOBt y DIPEA. La reacción se agitó a TA durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se purificó mediante cromatografía de columna usando metanol al 2-6 %: DCM para dar 35 mg (el 64 %) de **TAM467** como un sólido blanco. ESI-MS: m/z = 1371 [M+H].

Síntesis de Maleimido-val-cit-PABOCO-Tubulisina/Citolisina-TAM470:



TAM471

TAM470 (Tubulisina/Citolisina):	0,07 mmol
DMF:	5 ml
TAM466 (Enlazador):	50 mg (0,065 mmol)
HOBt:	2,4 mg
DIPEA:	18 µl

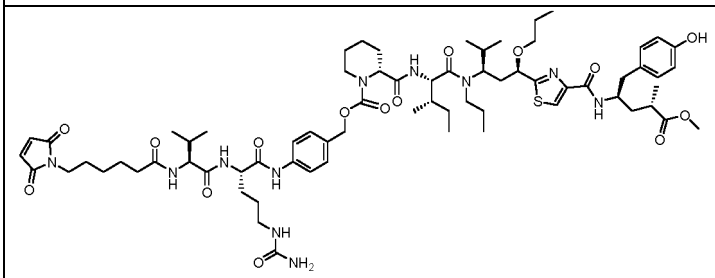
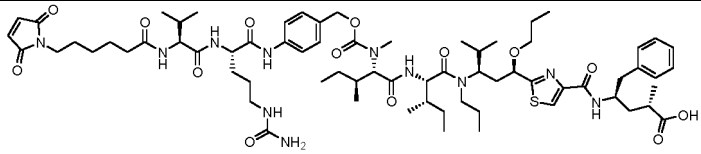
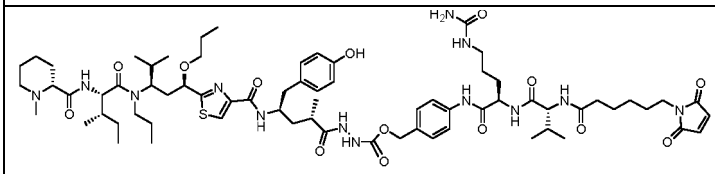
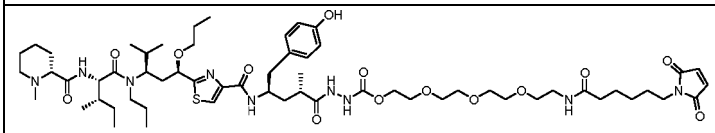
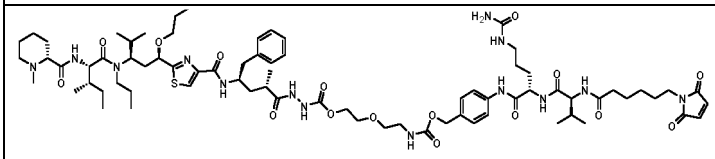
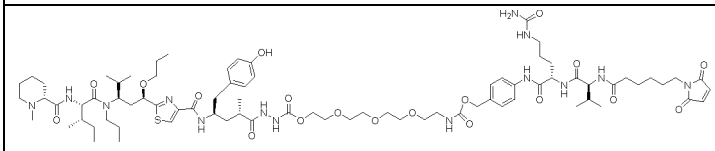
TAM470 y **TAM466** se disolvieron en DMF anhidro en condiciones secas y la solución resultante se trató con HOBt y DIPEA. La reacción se agitó a TA durante 18h y después se analizó con TLC, que indica la finalización de la reacción, La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se purificó mediante cromatografía de columna usando metanol al 4-12 %: DCM para dar 56 mg de **TAM471** (rendimiento: 62 %). ESI-MS: 1384.6 [M+1].

Se realiza un ensayo de la actividad *in vitro*. La actividad funcional se evalúa a través del ensayo de inhibición de microtúbulos, mientras que la actividad citotóxica se determina a través del ensayo de viabilidad de cristal violeta.

Generación de derivados de citolisina-enlazador

Se sintetizaron diferentes derivados de citolisina-enlazador de acuerdo con la estructura general presentada en la Figura 11, en donde el enlazador vcPABA se añadió bien en la posición R1 (TAM467, TAM551) o R4 (TAM471, TAM553, TAM558), solo o con espaciador de etilenglicol (EG; n=1 a 3), o sustituidos por grupos etilenglicol (n=3) (TAM552). Las respectivas estructuras químicas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Estructura química de derivados de citolisina-enlazador

Producto	Código	Mol. Peso
	TAM467	1370,7
	TAM551	1356,7
	TAM471	1384,7
	TAM552	1198,5
	TAM553	1499,8
	TAM558	1603,9

La actividad de inhibición de microtúbulos y la actividad citotóxica de cada nuevo derivado se evaluaron a través del ensayo de inhibición de la polimerización de tubulina (TPI; kit de ensayo de polimerización de tubulina; citoesqueleto, N.º de cat. BK011P), y la detención de la proliferación celular en células HT1080 (CPA; cristal violeta). Se calculó la CI50 y los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Actividad de inhibición de microtúbulos y actividad de citotoxicidad celular de derivados de citolisina-enlazador. ***(ND: No determinado)***

Compuesto	CI50 (Ensayo TPI; µM)	CI50 (Ensayo CPA; nM)
TAM467 (Enlazador en R1)	150	230-420
TAM551 (Enlazador en R1)	ND	90
TAM471 (Enlazador en R4; vcPABA)	14	17-42
TAM552 (Enlazador en R4; sin vcPABA; 3EG)	1,9	10
TAM553 (Enlazador en R4; vcPABA; 1EG)	6	98
TAM558 (Enlazador en R4; vcPABA; 3EG)	1,9	98
TAM334 (citolisina parental; sin enlazador)	2	0,3-0,6
Tubulisina A	ND	0,04-0,2
Tubulisina A + enlazador	ND	5-20
MMAE (Seattle Genetics)	ND	0,1-0,6
DM1-DM4 (Inmunógeno)	ND	0,01-0,1

La actividad *in vitro* de la citolisina parenteral TAM334 está dentro del mismo intervalo de otras cargas usadas actualmente para la generación de conjugados anticuerpo-fármaco tales como auristatinas (MMAE) o maitansinoides (DM1-DM4). Tal como se esperaba y se describió previamente para otros compuestos de la familia de la Tubulisina A, tras la adición del enlazador, la actividad citotóxica celular de las citolisinas se redujo con respecto al compuesto parental TAM334. Además, el derivado de TAM467 estaba presentando la actividad significativamente más baja en ambos ensayos. Todos los derivados se usaron en conjugación para generar moléculas de CAF y se evaluaron de manera comparativa tanto *in vitro* como *in vivo* para seleccionar el derivado citolisina-enlazador más activo.

Conjugación y caracterización química de los CAF

Cada uno de los derivados recién generados se conjugó con los anticuerpos humanos IgG1 monoclonales siguiendo un método de conjugación no específico de sitio sobre restos de cisteína. Para este objetivo, se redujo un lote de anticuerpos y se hizo reaccionar con cada uno de los derivados. Se probaron diferentes proporciones de TCEP para alcanzar el DAR óptimo de 3-4, menos del 10 % de anticuerpo libre y fármaco. Las condiciones de conjugación óptima fueron tal como siguen: TCEP=2,5 y 3,57 de niveles de tiol de Ellmann. Los conjugados anticuerpo-fármaco se purificaron después en G25 Sephadex y se analizaron mediante cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) para determinar su pureza, así como la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y la cromatografía de fase inversa de líquido polimérico (PLRP) para determinar el DAR, el contenido de anticuerpo libre y el perfil de distribución de diferentes especies de CAF (0-8 fármacos/mAb). El contenido de fármaco libre se evaluó mediante el método de detección de UV a 280nm. Los resultados del análisis químico se determinaron (no mostrado) y las características de los CAF se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Resumen de las características químicas de las diferentes moléculas de CAF

Lote	Fármaco	Conc. de mAb	HIC de mAb libre	DAR	Pureza de SEC a 280 nm	Fármaco libre	Volumen
HPS157-039-001	TAM471	1,195 mg/ml	10,1 %	3,38	92 %	0 %	~5,8 ml (6,931 mg)
HPS157-039-002	TAM551	1,332 mg/ml	22,4 %	3,08	74 %	0 %	~5,8 ml (7,726 mg)
HPS157-039-003	TAM552	1,319 mg/ml	5,1 %	3,84	97 %	0 %	~5,8 ml (7,650 mg)
HPS157-039-004	TAM553	1,305 mg/ml	7,0 %	4,10	84 %	0 %	~5,8 ml (7,569 mg)
HPS157-039-005	TAM558	1,332 mg ml	5,8 %	3,92	93 %	0 %	~5,8 ml (7,726 mg)

Los diversos fármacos produjeron diferentes niveles de agregación. De manera específica, el CAF HPS157-039-002 (TAM551) mostró los niveles de agregación más altos ya a DAR=3,08, dejando el 22,4 % de anticuerpo sin conjugar. Una conjugación preliminar con TAM467 también mostró alto nivel de agregación: a DAR 3,27, la pureza de SEC ya era solo del 67 % con el 16 % del fármaco libre (datos no mostrados). Estos datos estaban sugiriendo que el enlazador vcPABA en la posición R1 no era óptima para este tipo de moléculas de citolisina.

Evaluación *in vitro* de conjugados anticuerpo de citolisina-fármaco

Las moléculas de CAF de citolisina se evaluaron de forma comparativa *in vitro* mediante el ensayo de detención de la proliferación (tinción de cristal violeta). Los resultados se presentan en la Figura 10 y los valores de CI50 en la Tabla 7.

Tabla 7: Valores de CI_{50} obtenidos en el ensayo de detención de la proliferación (nM)

Compuesto	HT1080-WT	HT1080-AG(+)
TAM334	1,04	0,77
CAF-471 (HPS-157-039-001)	5,6	10,33
CAF-551 (HPS-157-039-002)	964	552
CAF-553 (HPS-157-039-004)	90	108
CAF-558 (HPS-157-039-005)	555	0,96

La localización del enlazador vcPABA solo en la posición R1 (CAF-551) generó conjugados de anticuerpo-fármaco con mucha menos actividad citotóxica *in vitro* con respecto a la posición R4 (CAF-471) (Figura 10; Tabla 7). Además, el aumento en el número de grupos etilenglicol como espaciador para el enlazador vcPABA en la posición R4 (CAF-471 (n=0) frente a CAF-553 (n=1) y CAF-558 (n=3)) demostró que aumenta la actividad citotóxica específica de antígeno *in vitro* (Figura 10). De hecho, mientras que CAF-471 y CAF-553 presentaron una actividad citotóxica baja y no específica de antígeno (intervalo de CI_{50} de 10 nM y 100 nM, respectivamente) sin diferencias entre las células

HT1080 de tipo silvestre (TS) y las que presentan el antígeno (AG), CAF-558 presentó una actividad citotóxica específica de intervalo de 1 nM con una proporción de 500 entre las células HT1080 AG y TS.

Ejemplo 6 - Evaluación in vivo del efecto antitumoral de conjugados anticuerpo-fármaco

Ambos tipos de inmunoconjugados, conjugados de recNgA- y citolisina-anticuerpo, se evaluaron para su efecto antitumoral *in vivo* en un modelo de ratón de xenoinjerto derivado de paciente para cáncer de páncreas (PAXF-736) seleccionado previamente para la expresión del antígeno.

Los estudios del intervalo de la dosis se realizaron para definir la dosis máxima tolerada para su uso en estudios de eficacia (no mostrado). Para los inmunoconjugados de recNgA, se descubrió una dosis tolerada más alta de 0,5 mg/kg, mientras que los conjugados de anticuerpo de lisina, independientemente del derivado usado, se administraron a dosis de 2,5 mg/kg hasta 20 mg/kg, sin ninguna pérdida de peso o efecto tóxico.

Después se administraron los inmunoconjugados una vez a la semana por vía intraperitoneal durante 5 semanas. El volumen tumoral y el peso corporal se midieron cada 2-3 días. Los ratones PDX tratados con vehículo y tratados con Gemcitabina (150 mg/kg) se usaron como grupos de control negativo y de control positivo, respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 11.

Los inmunoconjugados de recNgA (OMTX505) presentaron una alta eficacia antitumoral *in vivo* (60 %) a una dosis de 0,5 mg/kg en modelos de murino PDX de cáncer de páncreas (Figura 11A). Cuando se combinaba con gemcitabina, incluso mostraba el 100 % de la inhibición del crecimiento tumoral y la regresión del tumor.

De acuerdo con los resultados *in vitro* (véase la Figura 10 y la Tabla 7), la localización del enlazador vcPABA solo en la posición R1 (OMTX705-551) generó conjugados anticuerpo-fármaco sin actividad antitumoral *in vivo* (Figura 11B).

Apoyando los datos *in vitro*, el aumento en el número de grupos de etilenglicol como espaciador para el enlazador vcPABA en la posición R4 (OMTX705-471 (n=0) frente a OMTX705-553 (n=l) y OMTX705-558 (n=3)) demostró aumentar el efecto antitumoral *in vivo* (Figura 11C). OMTX705-471 y OMTX705-553 no mostraron ningún efecto antitumoral *in vivo,* mientras que OMTX705-558 presentó un efecto de inhibición del crecimiento tumoral del 40 % a una dosis de 2,5 mg/kg en un modelo de ratón de PDX para cáncer de páncreas.

A partir de estos datos, las moléculas de recNgA y TAM558 se seleccionaron como las mejores cargas para los conjugados anticuerpo anti-ENG-fármaco.

Ejemplo 7 - Modelos de sarcoma de Ewing

La plasticidad de las células tumorales permite que determinados tipos de células tumorales altamente malignas se desdiferencien y se involucren en un fenotipo plástico multipotente de tipo embrionario, que les permite 'adaptarse' durante la progresión tumoral y escapar de las estrategias terapéuticas convencionales. Un estudio reciente demostró que la expresión de ENG se correlaciona con la plasticidad de las células tumorales en el sarcoma de Ewing, y que se asocia de manera significativa con una peor supervivencia de los pacientes de sarcoma de Ewing. El sarcoma de Ewing con niveles reducidos de ENG mostró un crecimiento tumoral reducido *in vivo*. Este estudio, por lo tanto, delinea un papel importante de ENG en la plasticidad de células tumorales y la progresión de tumores agresivos *(51).*

Los presentes inventores hipotetizan el potencial terapéutico de anticuerpos monoclonales anti-ENG, IT y FAC, en el tratamiento de sarcoma de Ewing.

Se han desarrollado 14 modelos de líneas celulares de sarcoma de Ewing para estudios *in vitro*, y sus correspondientes modelos de xenoinjerto, para la selección sistemática y la caracterización de moléculas terapéuticas para el tratamiento de sarcoma de Ewing. Se ha confirmado la expresión de ENG en las 14 líneas celulares, y todas las muestras de pacientes humanos de sarcoma de Ewing (n=10) que se han examinado.

Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen a modo de ejemplo, no a modo de limitación. Todos los subtítulos en el presente documento se incluyen solo por comodidad, y no deben interpretarse como que limitan la divulgación de ninguna manera.

Referencias

1. Weinberg, R.A., et al., Garland science, Taylor & Francis Group LLC, New York, NY, USA, 2007
2. Nieman, K.M., et al., Nat. Med., 2011, 17: 1498-1503
3. Joyce, J.A., et al., Nat. Rev. Cancer, 2009, 9: 239-252
4. Hanahan, D., et al., Cancer Cell, 2012, 21: 309-322
5. Gupta, G.P., et al., Cell, 2006: 127: 679-695
6. Valastyan, S., et al., Cell, 2011, 147: 275-292
7. Meads, M.B, et al., Nat. Rev. Cancer, 2009, 9: 665-674

8. Olive, K.P., et al., Science, 2009, 324: 1457-1461
9. Acharyya, S., et al., Cell, 2012, 150: 165-178
10. Crawford, Y., et al. Cancer Cell, 2009, 15: 21-34
11. Straussman, R., Nature, 2012, 487: 500-504
12. Joyce, J.A., et al., Cancer Cell, 2005, 7: 513-520
13. Hanahan, D., et al., Cell, 2011, 144: 646-674
14. Kalluri, R., Nat. Rev. Cancer, 2006, 6: 392-401
15. Pietras, K., et al., Exp. Cell Res., 2010, 316: 1324-1331
16. Orimo, A., et al., Cell, 2005, 121: 335-348
17. Erez, N., et al., Cancer Cell, 2010, 17: 135-147
18. Olumi, A.F., et al., Cancer Res., 1999, 59: 5002-5011
19. Yang, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 16472-16477
20. Hwang, R.F., et al., Cancer Res., 2008, 68: 918-926
21. Hu, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106: 3372-3377
22. Medema, J.P., et al., Nature, 2011, 474: 318-326
23. Malanchi, I., et al., Nature, 2012, 481: 85-89
24. Strell, C., et al., Ups. J. Med. Sci., 2012, 117: 187-195
25. Horimoto, Y., et al., Cell Adhes. Migr., 2012, 6: 193202
26. Wu, et al., J. Cancer Mol., 2008, 4: 37-45
27. Kumar S., et al., Cancer Res., 1999, 59: 856-861
28. Li C., et al., Int.J. Cancer, 2000, 89: 122-126
29. Völkel T., et al., Bioch. and Bioph. Res. Com., 2004, 317: 515-521
30. Rüger R., et al., J. of Drug Targeting, 2006, 14: 576-582
31. Müller D., et al., J. of Immun. Methods, 2008, 339: 90-98
32. Uneda S., et al., Int. J. Cancer, 2009, 125: 1446-1453
33. Fonsatti E., et al., Cardiovasc. Res., 2010, 86: 12-19
34. Seon B.K., et al., Curr. Drug Deliv, 2011, 8: 135-143
35. Ferreras J.M., et al., Toxins, 2011, 3: 420-441
36. Muñoz R., et al., Cancer Immunol. Immunother., 2012.
37. Muñoz et al., Cancer Res., 2001
38. *Trush et al., Annu. Rev. Immunol., 1996, 14:49-71*
39. Lambert *et al.,* 1988,
40. *Barbieri, et al., Methods in Mol. Biol., 2001, 166: 71-85*
41. *Ghetie and Vitetta, Mol. Biotechnol., 2001, 18: 251-286*
42. Muñoz R., et al., Cancer Lett., 2007, 256: 73-80.
43. *Thorpe et al., Cancer Res., 1987, 47:5924-5931*
44. *Fracasso et al., Mini Rev. Med. Chem., 2004, 4: 545-562*
45. *Marsh et al., "Immunotoxins", Frankel A.E. ed., Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 1988, 213-237*
46. *Riddles et al., Anal. Biochem., 1979, 94:75-81*
47. *Riener et al., Anal. Bioanal. Chem, 2002, 373:266-276*
48. *Gualberto A. Expert Opin Investig Drugs. 2012; 21(2): 205-16*
49. *Perez-Soler et al., Clin. Cancer Res., 2000, 6: 4932-4938;*
50. *Yabuchi et al., Cancer Letters, 2013*
51. *Padarli et al., Oncogene, 2011, 20: 334-345*

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Oncomatryx Biopharma, S.L.

<120> Conjugados anticuerpo-fármaco e inmunotoxinas

<130> CSC/FP7100084

<140> TBC
<141> TBC

<150> GB 1402009.3
<151> 06/02/2014

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 467
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-IgG1-HC anti-endoglina humana

<400> 1

```
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
            20                  25                  30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
        35                  40                  45

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Tyr Gly Ser Asp Gly Asp Thr Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Phe Tyr Thr Ala Gly Phe Asp Tyr Trp
        115                 120                 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
    130                 135                 140
```

```
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145                 150                 155                 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
            180                 185                 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
        195                 200                 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
    210                 215                 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225                 230                 235                 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
                245                 250                 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        275                 280                 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    290                 295                 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                325                 330                 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
            340                 345                 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400
```

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 2
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-IgG1-LC anti-endoglina humana

<400> 2

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Ile Ser Ser Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Pro
100 105 110

Ala Lys Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

```
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 3
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-IgG1-HC - sin secuencia señal

<400> 3

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Tyr Gly Ser Asp Gly Asp Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Arg Val Phe Tyr Thr Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350
```

```
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-IgG1-LC - sin secuencia señal

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Pro Ala Lys Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
```

```
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-VH

<400> 5

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Tyr Gly Ser Asp Gly Asp Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Val Phe Tyr Thr Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

                100                 105                 110

    Leu Val Thr Val Ser Ser
            115
```

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-VL

<400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Pro Ala Lys Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

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

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-CDRH1

<400> 7

```
Ser Tyr Ala Met Ser
1               5
```

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-CDRH2

<400> 8

```
Ala Ile Tyr Gly Ser Asp Gly Asp Thr Thr Tyr
1               5                   10
```

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

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-CDRH3

<400> 9

Val Phe Tyr Thr Ala Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-CDRL1

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Leu Asn
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-CDRL2

<400> 11

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: A5-CDRL3

<400> 12

Gln Gln Ala Pro Ala Lys Pro Pro Thr

1 5

<210> 13
<211> 466
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-IgG1-HC anti-endoglina de murino

<400> 13

```
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
            20                  25                  30

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
        35                  40                  45

Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Val Trp Val Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Thr Gly Thr Trp Val Met Ser Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
    130                 135                 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145                 150                 155                 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
                165                 170                 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
            180                 185                 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
        195                 200                 205
```

```
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
    210                 215                 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230                 235                 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
                405                 410                 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
```

450 455 460

Gly Lys
465

<210> 14
<211> 232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-lgG1-LC anti-endoglina de murino

<400> 14

```
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

Gly Ser Thr Gly Ser Ser Glu Leu Ile Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
            20                  25                  30

Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
        35                  40                  45

Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
    50                  55                  60

Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
65                  70                  75                  80

Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
                85                  90                  95

Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Gly Thr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
        115                 120                 125

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
    130                 135                 140

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
                165                 170                 175

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
            180                 185                 190

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
        195                 200                 205

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
    210                 215                 220

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225                 230
```

<210> 15
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-IgG1-HC - sin secuencia señal

<400> 15

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
        35                  40                  45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Ala Thr Gly Thr Trp Val Met Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415
```

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

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

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-IgG1-LC - sin secuencia señal

<400> 16

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Thr Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn
100 105 110

Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 17
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-VH

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Thr Gly Thr Trp Val Met Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-VL

<400> 18

```
Ser Ser Glu Leu Ile Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1               5                   10                  15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
            20                  25                  30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
        35                  40                  45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Thr Val
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
            100                 105
```

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-CDRH1

<400> 19

```
Ser Tyr Gly Met His
1               5
```

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-CDRH2

<400> 20

```
Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-CDRH3

<400> 21

Ala Thr Gly Thr Trp Val Met Ser
1 5

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-CDRL1

<400> 22

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-CDRL2

<400> 23

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: mE12-CDRL3

<400> 24

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Thr Val
1 5

<210> 25
<211> 256
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de aminoácidos de cadena A de nigrina b recombinante

<400> 25

```
Met Ile Asp Tyr Pro Ser Val Ser Phe Asn Leu Asp Gly Ala Lys Ser
1               5                  10                  15

Ala Thr Tyr Arg Asp Phe Leu Ser Asn Leu Arg Lys Thr Val Ala Thr
            20                  25                  30

Gly Thr Tyr Glu Val Asn Gly Leu Pro Val Leu Arg Arg Glu Ser Glu
        35                  40                  45

Val Gln Val Lys Ser Arg Phe Val Leu Val Pro Leu Thr Asn Tyr Asn
    50                  55                  60

Gly Asn Thr Val Thr Leu Ala Val Asp Val Thr Asn Leu Tyr Val Val
65                  70                  75                  80

Ala Phe Ser Gly Asn Ala Asn Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Thr Glu
                85                  90                  95

Val Gln Lys Ser Asn Leu Phe Val Gly Thr Lys Gln Asn Thr Leu Ser
            100                 105                 110

Phe Thr Gly Asn Tyr Asp Asn Leu Glu Thr Ala Ala Asn Thr Arg Arg
        115                 120                 125

Glu Ser Ile Glu Leu Gly Pro Ser Pro Leu Asp Gly Ala Ile Thr Ser
    130                 135                 140

Leu Tyr His Gly Asp Ser Val Ala Arg Ser Leu Leu Val Val Ile Gln
145                 150                 155                 160

Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Glu Gln Glu Val Arg
                165                 170                 175

Arg Ser Leu Gln Gln Ala Thr Ser Phe Thr Pro Asn Ala Leu Met Leu
            180                 185                 190

Ser Met Glu Asn Asn Trp Ser Ser Met Ser Leu Glu Ile Gln Gln Ala
        195                 200                 205

Gly Asn Asn Val Ser Pro Phe Phe Gly Thr Val Gln Leu Leu Asn Tyr
    210                 215                 220

Asp His Thr His Arg Leu Val Asp Asn Phe Glu Glu Leu Tyr Lys Ile
225                 230                 235                 240

Thr Gly Ile Ala Ile Leu Leu Phe Arg Cys Ser Ser Pro Ser Asn Asp
                245                 250                 255
```

<210> 26
<211> 765
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena A de nigrina b

<400> 26

atagactatc cctccgtctc cttcaacttg gatggagcca agtcggctac atacagggac 60

ttcctcagca acctgcgaaa aacagtggca actggcacct atgaagtaaa cggtttacca 120

gtactgaggc gcgaaagtga agtacaggtc aagagtcggt tcgttctcgt ccctctcacc 180

aattacaatg gaaacaccgt cacgttggca gtagatgtga ccaaccttta cgtggtggct 240

tttagtggaa atgcaaactc ctacttttttc aaggacgcta cggaagttca aaagagtaat 300

ttattcgttg gcaccaagca aaatacgtta tccttcacgg gtaattatga caaccttgag 360

actgcggcga atactaggag ggagtctatc gaactgggac ccagtccgct agatggagcc 420

attacaagtt tgtatcatgg tgatagcgta gcccgatctc tccttgtggt aattcagatg 480

gtctcggaag cggcaaggtt cagatacatt gagcaagaag tgcgccgaag cctacagcag 540

gctacaagct tcacaccaaa tgctttgatg ctgagcatgg agaacaactg gtcgtctatg 600

tccttggaga tccagcaggc gggaaataat gtatcaccct tctttgggac cgttcagctt 660

ctaaattacg atcacactca ccgcctagtt gacaactttg aggaactcta taagattacg 720

gggatagcaa ttcttctctt ccgttgctcc tcaccaagca atgat 765

<210> 27
<211> 658
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu
20 25 30

Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln
35 40 45

Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val
50 55 60

```
His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu
65                  70                  75                  80

Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu
                85                  90                  95

Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu
            100                 105                 110

Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln
        115                 120                 125

Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr
    130                 135                 140

Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala
145                 150                 155                 160

Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln
                165                 170                 175

Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg
            180                 185                 190

Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His
        195                 200                 205

Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu
    210                 215                 220

Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu
225                 230                 235                 240

Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro
                245                 250                 255

Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp
            260                 265                 270

Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg
        275                 280                 285

Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg
    290                 295                 300

Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala
305                 310                 315                 320
```

```
Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr
                325                 330                 335

Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro
            340                 345                 350

Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met
        355                 360                 365

Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile
    370                 375                 380

Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly
385                 390                 395                 400

Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val
                405                 410                 415

Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
    450                 455                 460

Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser
465                 470                 475                 480

Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
                485                 490                 495

Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala
            500                 505                 510

Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
        515                 520                 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr
    530                 535                 540

Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln
545                 550                 555                 560

Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser
```

565 570 575

Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Pro Ala Val
580 585 590

Leu Gly Ile Thr Phe Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala
595 600 605

Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Arg Ser Pro Ser Lys Arg Glu
610 615 620

Pro Val Val Ala Val Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr
625 630 635 640

Asn His Ser Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser
645 650 655

Met Ala

<210> 28
<211> 653
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

Met Asp Arg Gly Val Leu Pro Leu Pro Ile Thr Leu Leu Phe Val Ile
1 5 10 15

Tyr Ser Phe Val Pro Thr Thr Gly Leu Ala Glu Arg Val Gly Cys Asp
20 25 30

Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser
35 40 45

Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu
50 55 60

Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu
65 70 75 80

Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Gln Glu Val
85 90 95

Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala
100 105 110

Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe

```
        115                 120                 125

Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser
    130                 135                 140

Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser
145                 150                 155                 160

Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln
                165                 170                 175

Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met
            180                 185                 190

Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln Ser
        195                 200                 205

Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu Arg
    210                 215                 220

Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met Met
225                 230                 235                 240

Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly Pro
                245                 250                 255

Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn His Ser Met Gln Ile Leu
            260                 265                 270

Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe Pro Gly Ser Lys Val Lys
        275                 280                 285

Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Ile Ala Glu Ala Arg
    290                 295                 300

Lys Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Val
305                 310                 315                 320

Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys Gly Gly Val Phe Gln Thr
                325                 330                 335

Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro
            340                 345                 350

Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys Cys Gly Asn Gln Val Met
        355                 360                 365
```

```
Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln Thr Leu Gln Cys Thr Ile
    370                 375                 380

Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys Gln Ala Glu Asp Thr Asp
385                 390                 395                 400

Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys Val
                405                 410                 415

Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile Ile Ser Phe Pro Ser Gly
            420                 425                 430

Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys Ile Asp Met Asp Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
    450                 455                 460

Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val Ser
465                 470                 475                 480

Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
                485                 490                 495

Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr Ala
            500                 505                 510

Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
        515                 520                 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala
    530                 535                 540

Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln
545                 550                 555                 560

Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Ile Val Ser Pro Asp
                565                 570                 575

Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Leu Pro Ser Val Leu Gly Ile Thr Phe
            580                 585                 590

Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Trp Tyr Ile
        595                 600                 605

Tyr Ser His Thr Arg Gly Pro Ser Lys Arg Glu Pro Val Val Ala Val
    610                 615                 620
```

```
Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr Asn His Ser Ile Gly
625                 630                 635                 640

Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser Met Ala
                645                 650
```

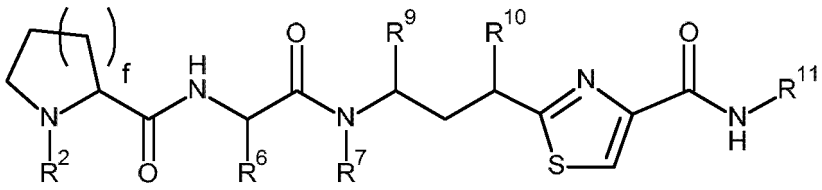
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo-fármaco que tiene la fórmula I:

$$A\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad (I)$$

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde:

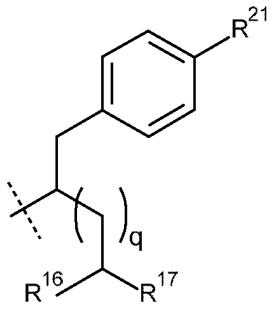
A es un anticuerpo que se une de manera selectiva a la endoglina;
L es un enlazador;
p es de 1 a 10; y
D es un fármaco que comprende una citolisina de fórmula IV:



(IV)

en donde:

R^2 es H o alquilo C_1-C_4;
R^6 es alquilo C_1-C_6;
R^7 es alquilo C_1-C_6, CH_2OR^{19} o CH_2OCOR^{20}, en donde R^{19} es alquilo, R^{20} es alquenilo C_2-C_6, fenilo o CH_2-fenilo;
R^9 es alquilo C_1-C_6;
R^{10} es H, OH, O-alquilo u O-acetilo;
f es 1 o 2;
R^{11} tiene la siguiente estructura:



en donde

R^{21} es H, OH, halógeno, NH_2, alquiloxi, fenilo, alquilamino o dialquilamino;
R^{16} es H o un grupo alquilo C_1-C_6;
R^{17} está unido directa o indirectamente al enlazador L; y
q es 0, 1, 2 o 3.

2. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde A comprende las regiones determinantes de complementariedad 1-3 de la cadena pesada (CDRH1-3) y las regiones determinantes de complementariedad 1-3 de la cadena ligera (CDRL1-3) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

(i) CDRH1: la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 7;
(ii) CDRH2: la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 8;
(iii) CDRH3: la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 9;
(iv) CDRL1: la SEQ ID NO: 10 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 10;
(v) CDRL2: la SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en

comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 11; y
(vi) CDRL3: la SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma que tiene hasta 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO: 12.

3. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 2, en donde A comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

4. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 2, en donde A comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

5. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R^{17} es C(O)X, CONHNHX, OX, NHX o SX, en donde X es un enlace al enlazador L.

6. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el enlazador L comprende además un espaciador.

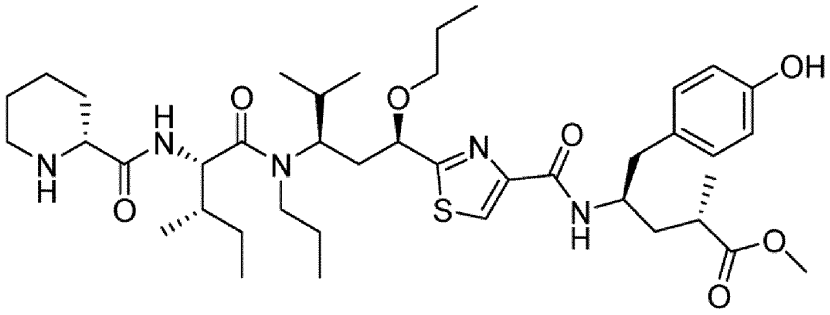
7. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 6, en donde el espaciador tiene una longitud de cadena de 2 a 30 átomos.

8. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 6 o de la reivindicación 7, en donde el espaciador comprende o consiste en un grupo $-(CH_2)_n-$ o $-(OCH_2CH_2)_n-$, en donde n = 1 a 10.

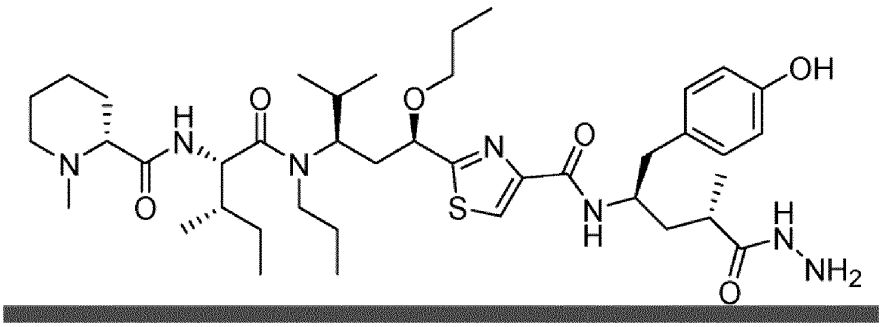
9. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el espaciador está directamente unido al grupo R^{17}, o se une al grupo R^{17} a través de un grupo puente.

10. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 9, en donde el espaciador se une al grupo R^{17} a través de un grupo puente -C(O)X, en donde X es un enlace a R^{17}.

11. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde D comprende una citolisina que tiene la siguiente estructura:



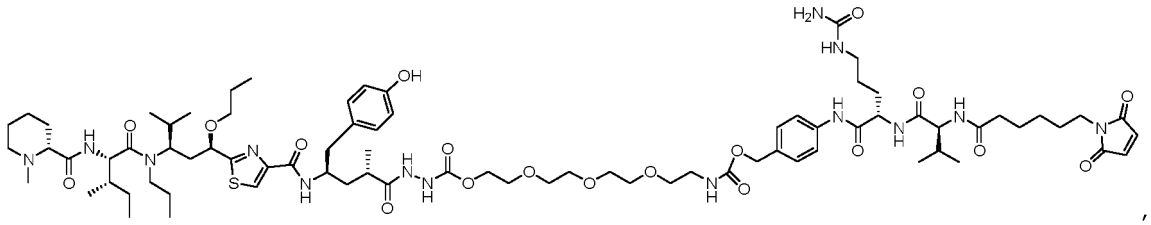
o



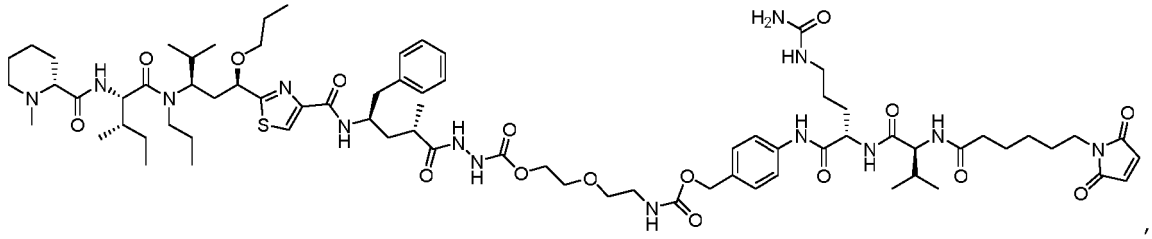
12. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde L comprende un grupo de unión para la unión a A y una porción escindible de proteasa.

13. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 12, en donde L comprende maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobencilcarbamato.

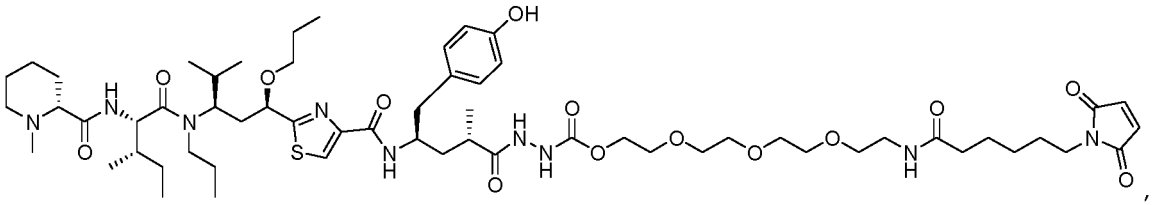
14. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde -L-D tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



,

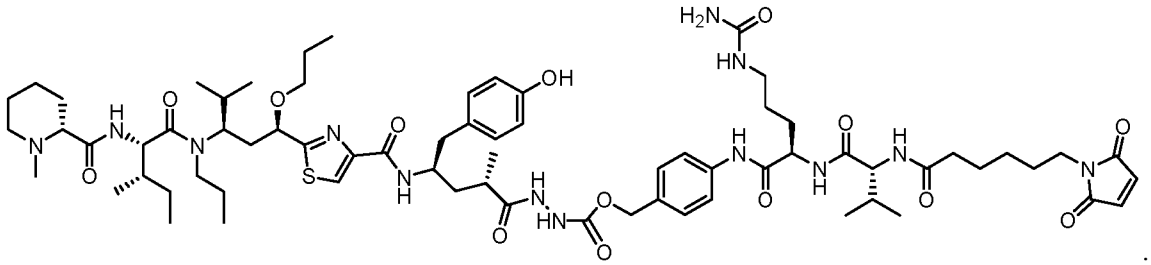


,



,

y



.

15. Un conjugado anticuerpo-fármaco tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en medicina.

16. Un conjugado anticuerpo-fármaco tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en un método de tratamiento de un tumor en un sujeto mamífero.

17. El conjugado anticuerpo-fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicho conjugado anticuerpo-fármaco es para la administración simultánea, secuencial o separada con uno o más otros fármacos antitumorales.

18. El conjugado anticuerpo-fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dichos uno o más otros fármacos antitumorales comprenden un agente quimioterapéutico citotóxico o un agente anti-angiogénico o un agente inmunoterapéutico.

19. El conjugado anticuerpo-fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dichos uno o más otros fármacos antitumorales comprenden Gemcitabina, Abraxano bevacizumab, itraconazol, carboximidotriazol, una molécula anti-PD-1 o una molécula anti-PD-LI.

20. El conjugado anticuerpo-fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha molécula anti-PD-1 o una molécula anti-PD-LI comprende nivolumab o pembrolizumab.

21. El conjugado anticuerpo-fármaco para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en donde el tumor es una neoplasia sanguínea, cáncer de páncreas, sarcoma de Ewing, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de vejiga o cáncer de colon.

22. El conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en un método de tratamiento de una afección inflamatoria o de una enfermedad ocular.

23. El conjugado anticuerpo-fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde:

dicha afección inflamatoria es artritis reumatoide; y/o
dicha enfermedad ocular es retinopatía diabética o degeneración macular.

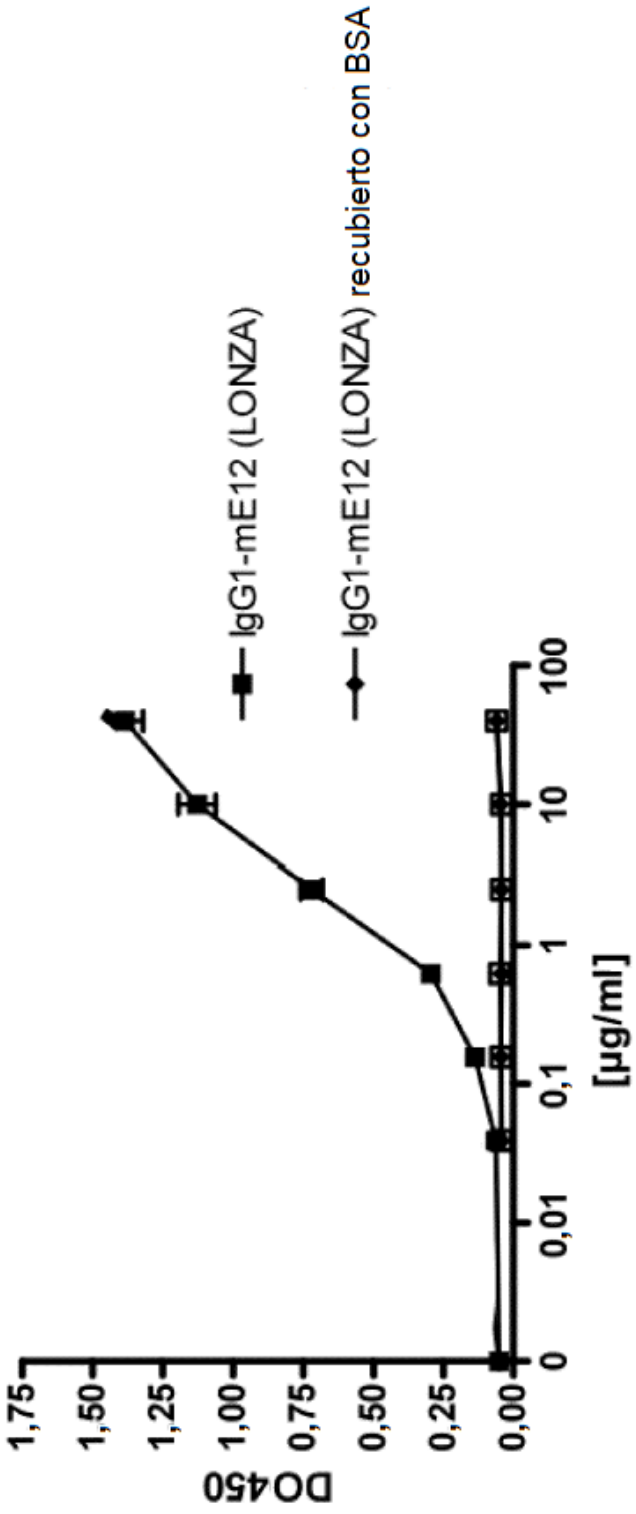
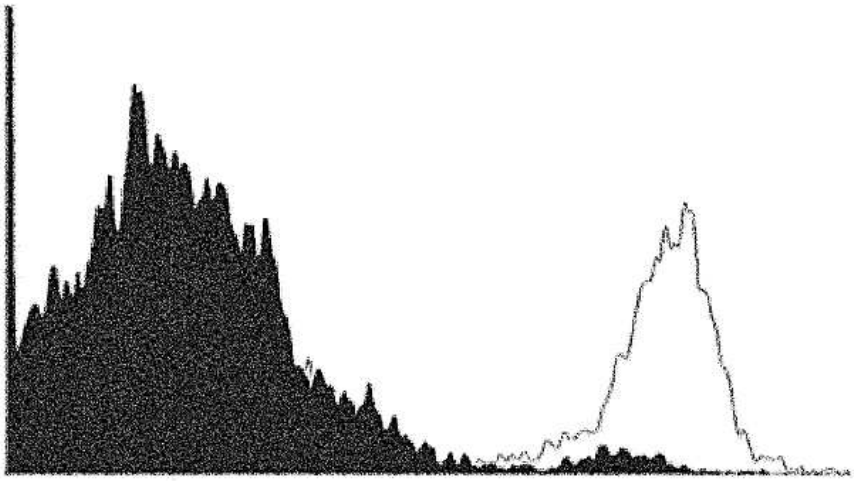

IgG1-mE12 (LONZA)
IgG1-mE12 (LONZA) recubierto con BSA
DO450
1,75
1,50
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0
0,01
0,1
1
10
100
[µg/ml]

Figura 1

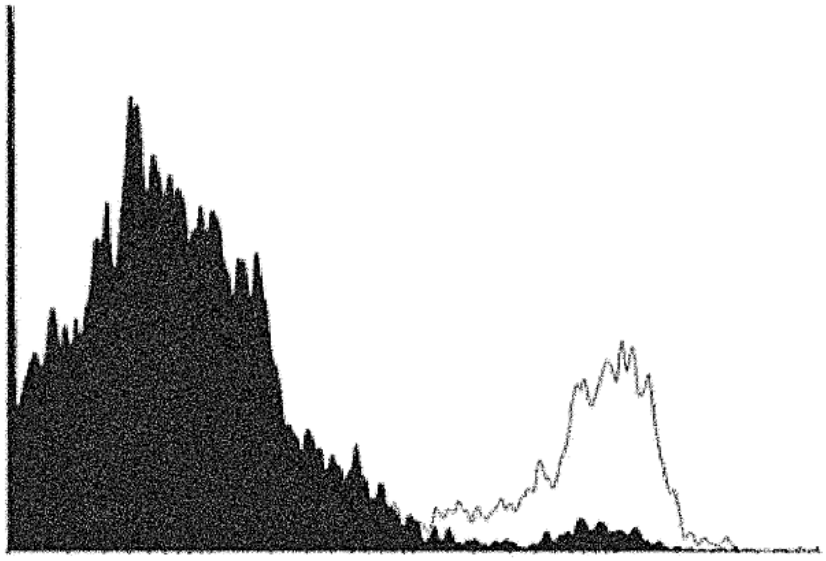
a)



B16 + IgG1 mE12 (50 µg/ml)

Figura 2A

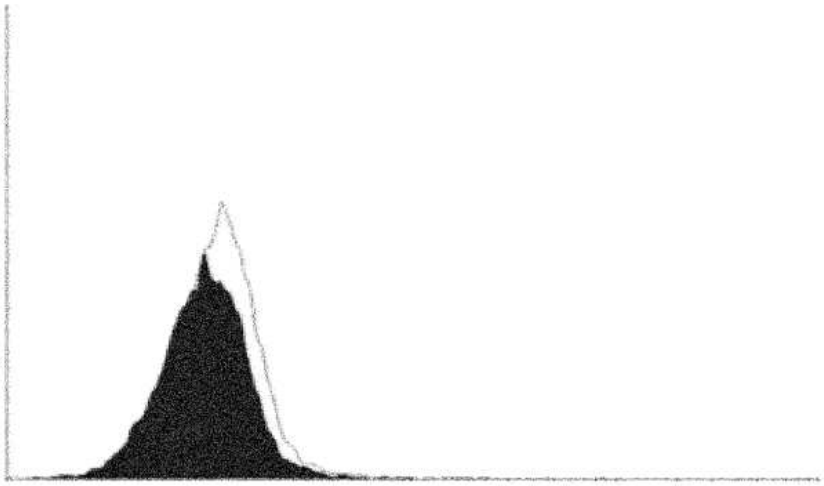
b)



B16 + IgG1 mE12 (5 µg/ml)

Figura 2B

c)



H1080 + IgG1 mE12 (5 µg/ml)

Figura 2C

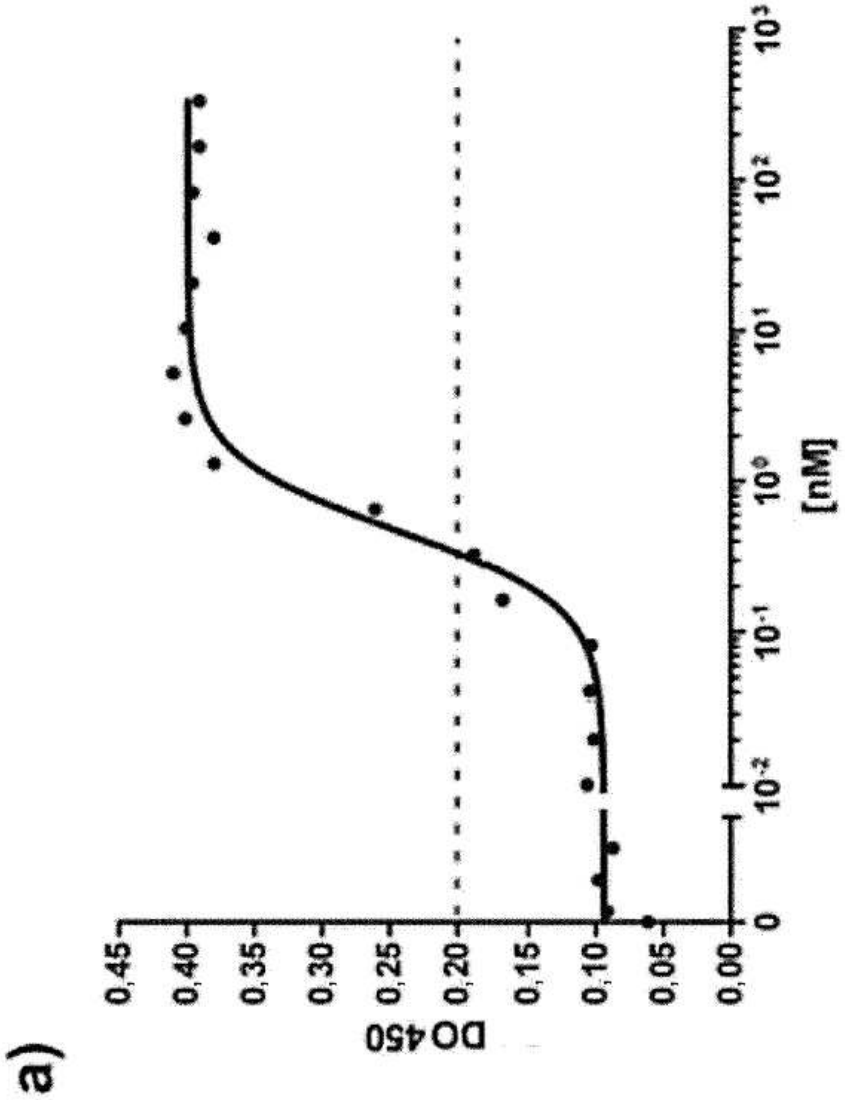

a)
DO 450
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
[nM]

Figura 3A

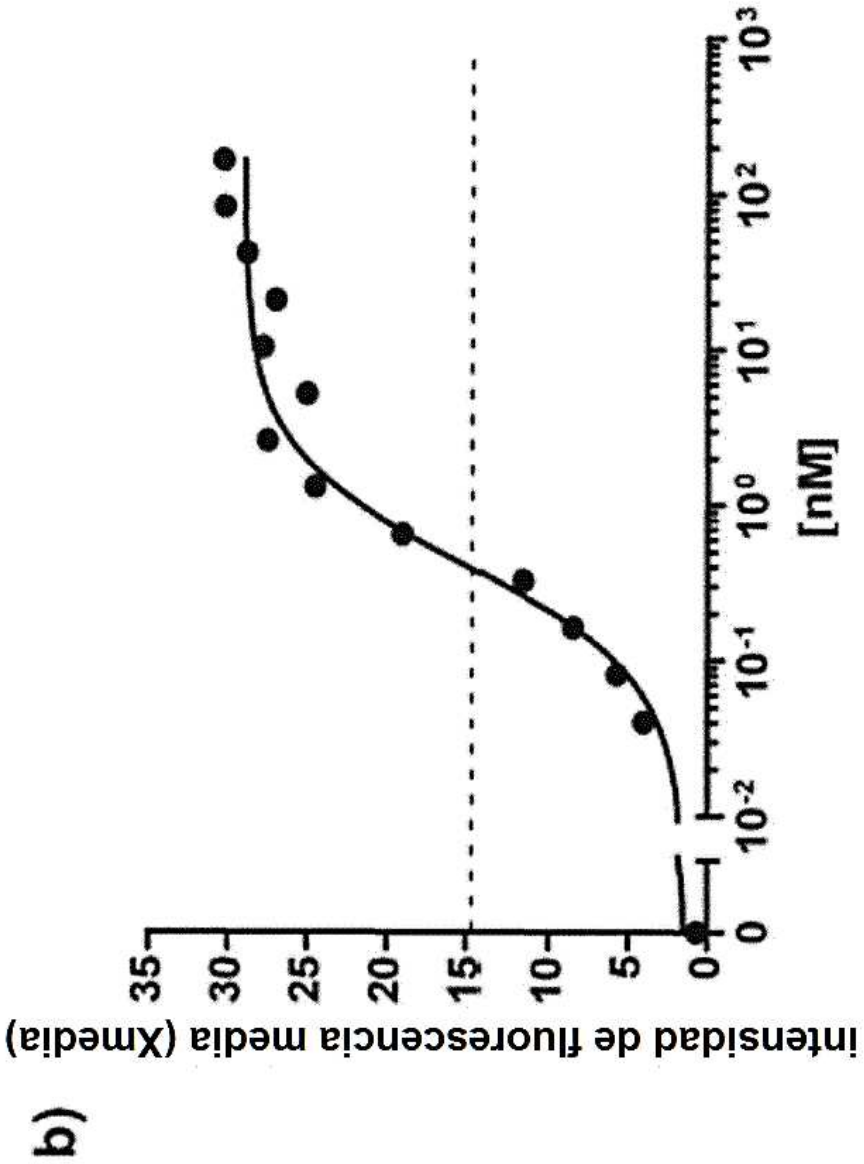

b)
intensidad de fluorescencia media (Xmedia)
0
5
10
15
20
25
30
35
0
10-2
10-1
100
101
102
103
[nM]

Figura 3B

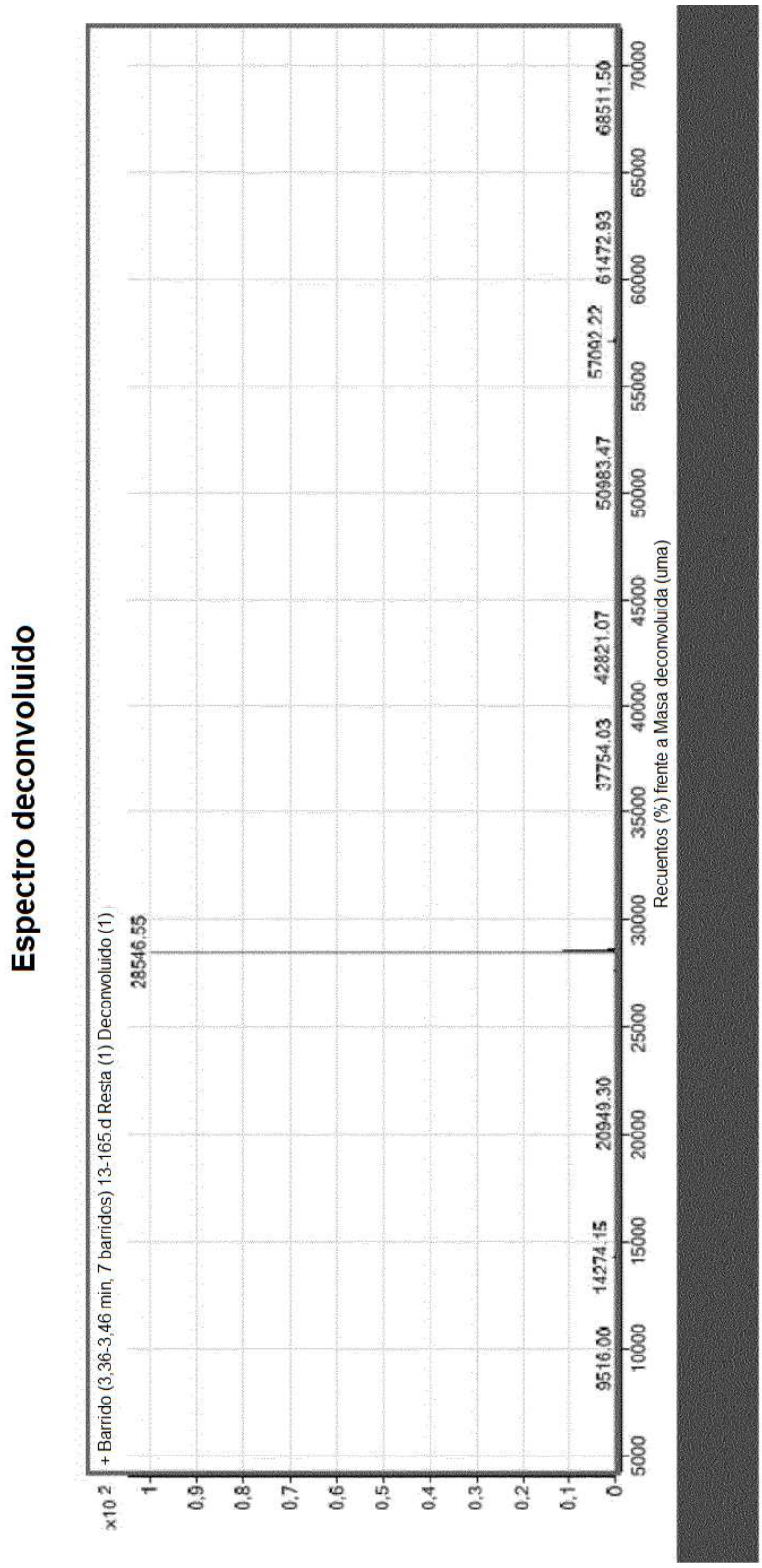

Espectro deconvoluido
+ Barrido (3,36-3,46 min, 7 barridos) 13-165.d Resta (1) Deconvoluido (1)
x10 2
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
28546.55
9516.00
14274.15
20949.30
37754.03
42821.07
50983.47
57092.22
61472.93
68511.59
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
50000
55000
60000
65000
70000
Recuentos (%) frente a Masa deconvoluida (uma)

Figura 4

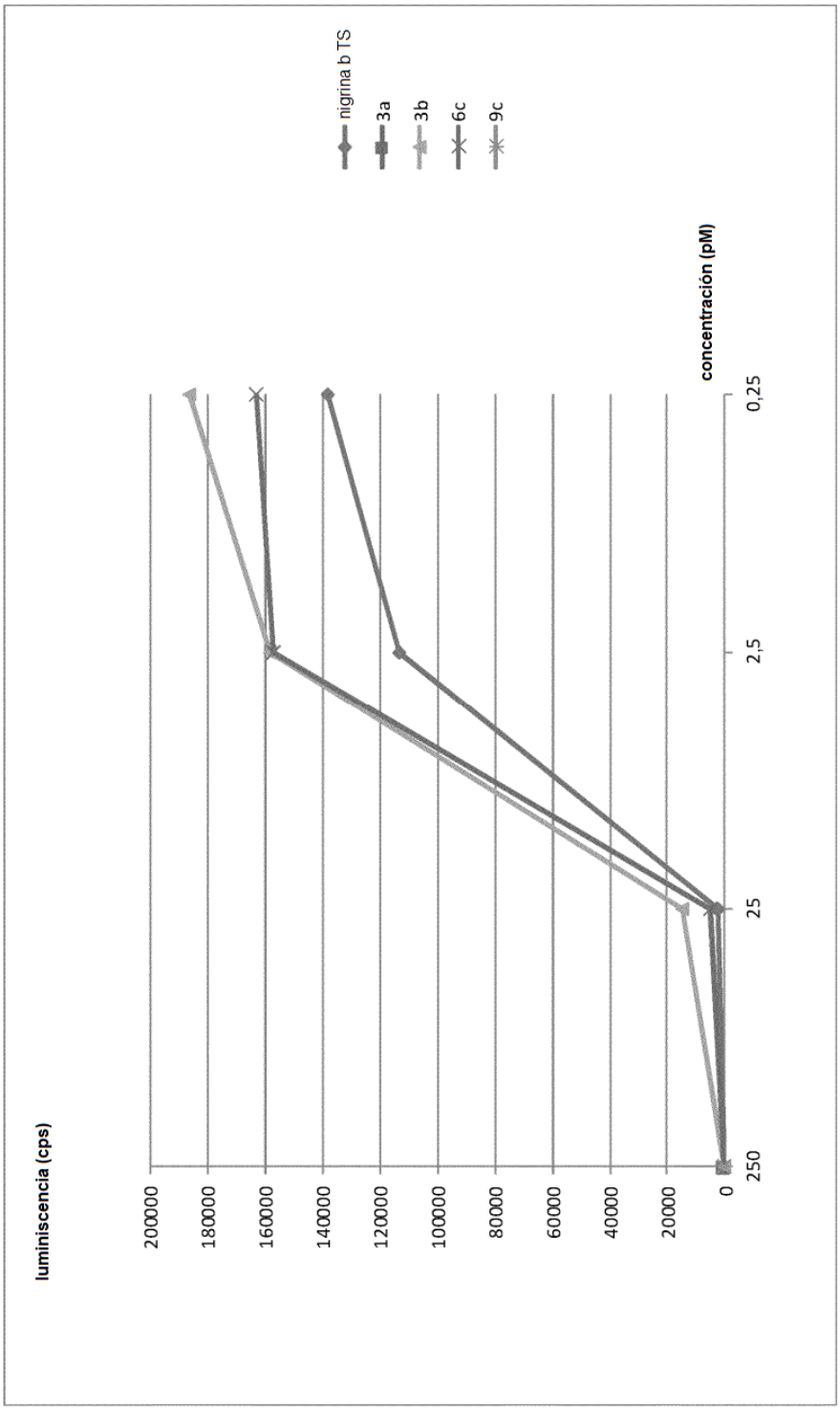

nigrina b TS
3a
3b
6c
9c
concentración (pM)
luminiscencia (cps)
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
250
25
2,5
0,25

Figura 5

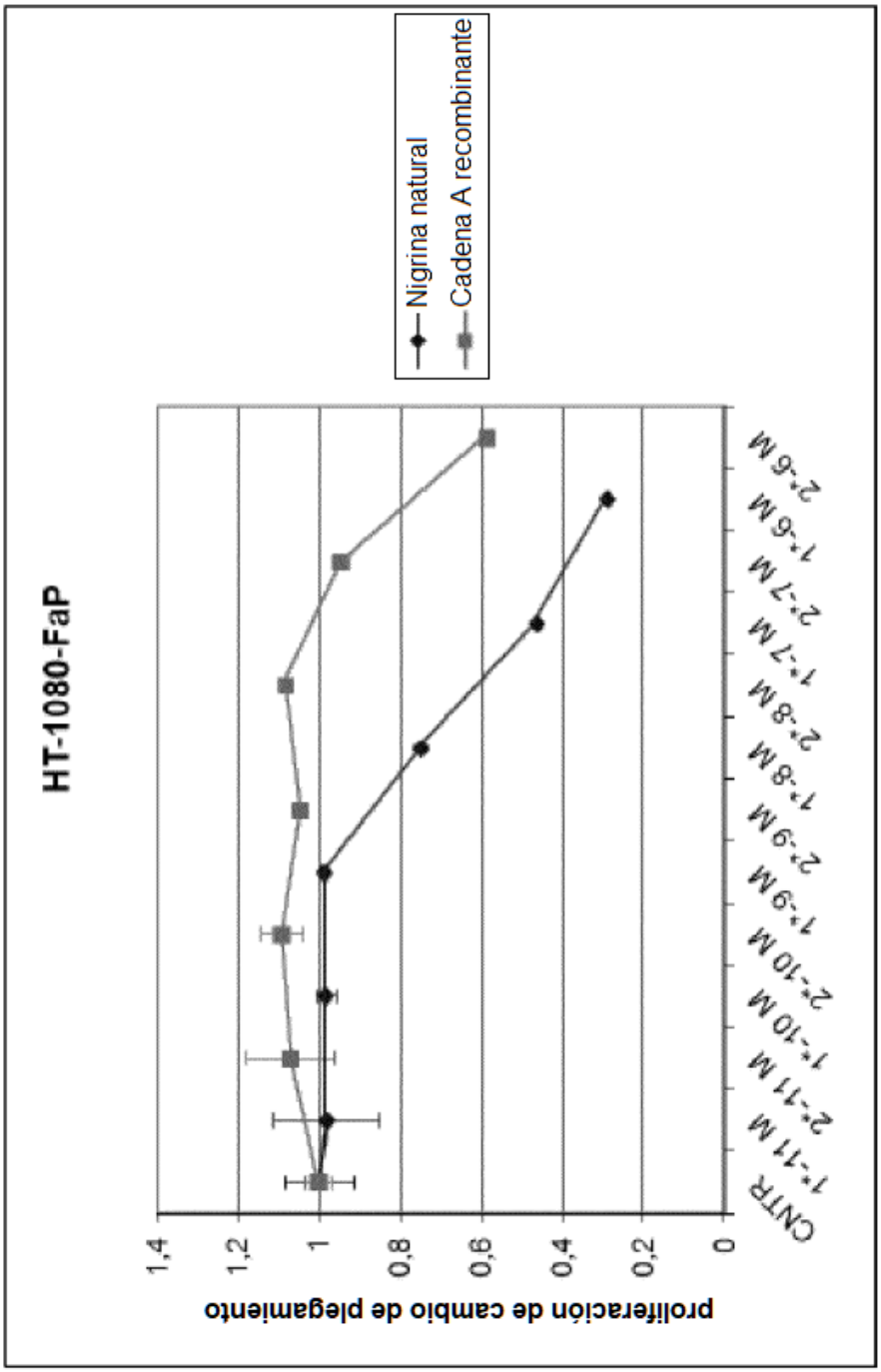

HT-1080-FaP
Nigrina natural
Cadena A recombinante
proliferación de cambio de plegamiento
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
CNTR
1-11 M
2-11 M
1-10 M
2-10 M
1-9 M
2-9 M
1-8 M
2-8 M
1-7 M
2-7 M
1-6 M
2-6 M

Figura 6

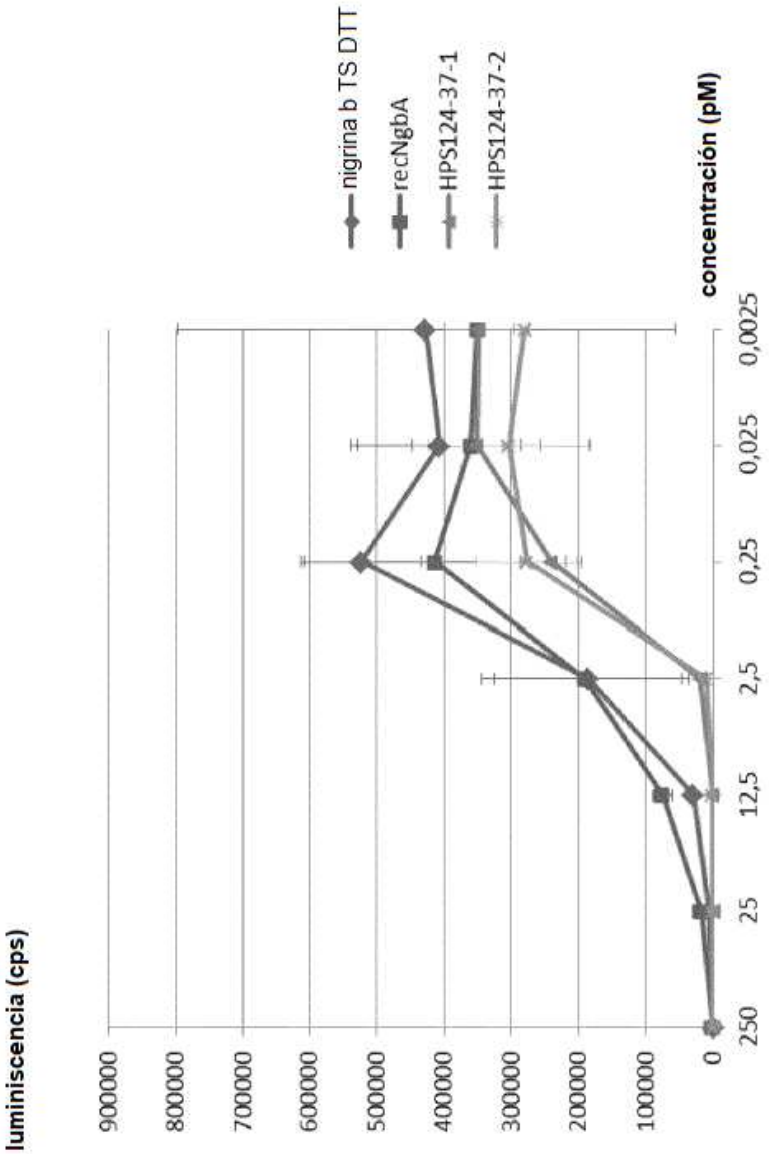

luminiscencia (cps)
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
250
25
12,5
2,5
0,25
0,025
0,0025
concentración (pM)
nigrina b TS DTT
recNgbA
HPS124-37-1
HPS124-37-2

Figura 7

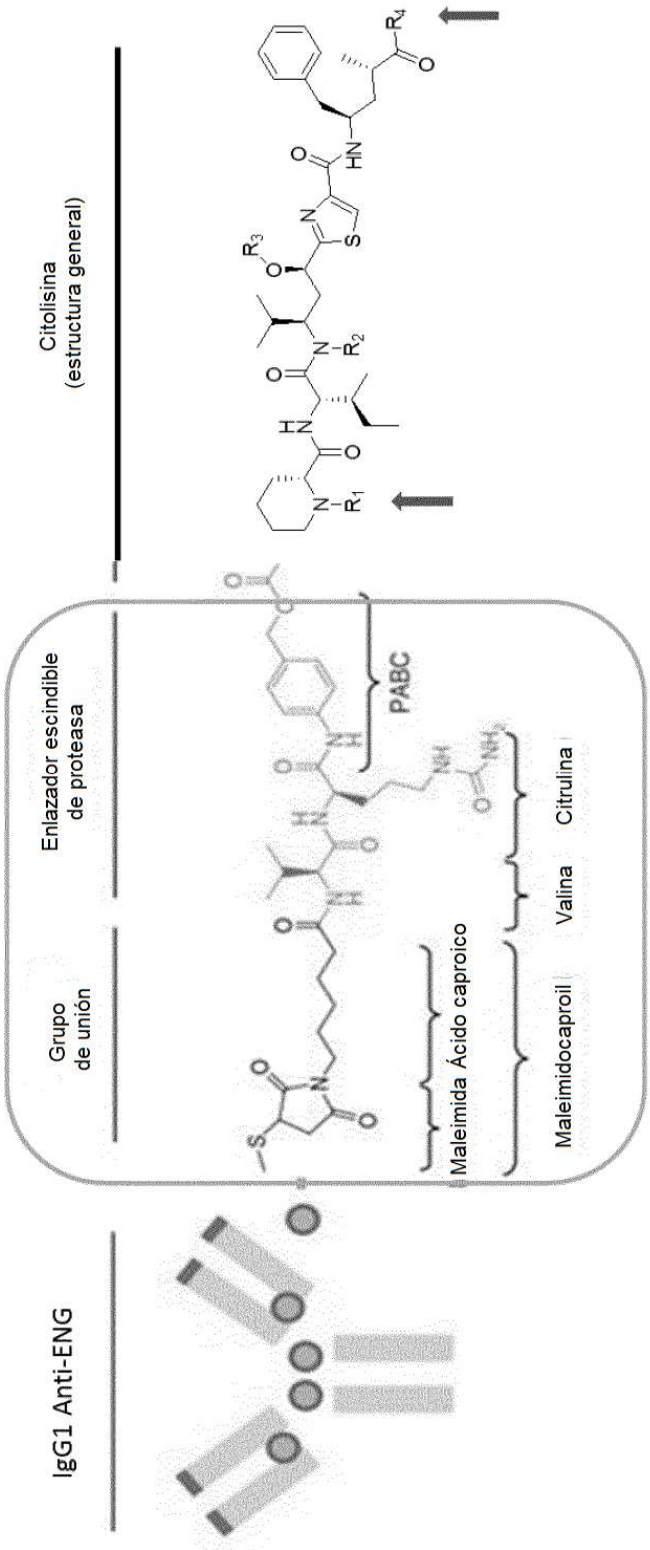

IgG1 Anti-ENG
Grupo de unión
Enlazador escindible de proteasa
Citolisina (estructura general)
Maleimidocaproil
Valina
Citrulina
Maleimida Ácido caproico
PABC
enlazador vcPABA

Figura 8

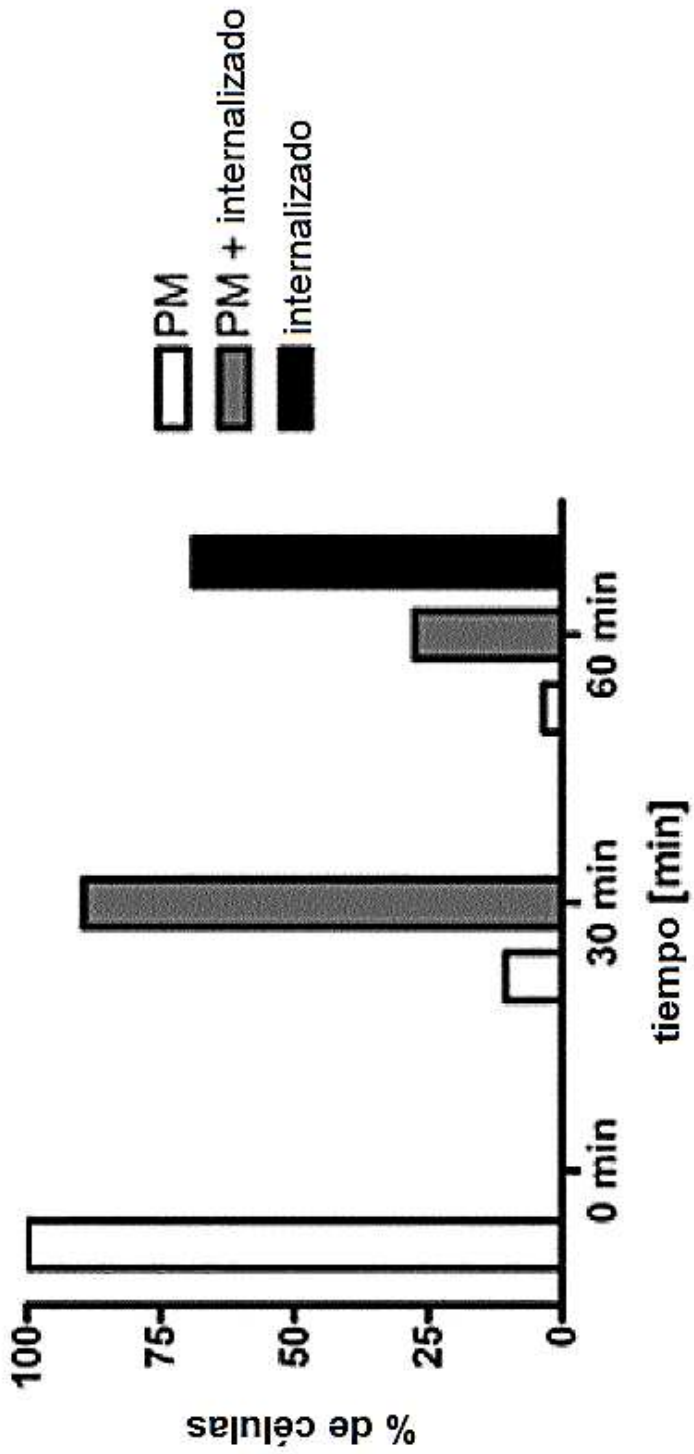

PM
PM + internalizado
internalizado
% de células
100
75
50
25
0
0 min
30 min
60 min
tiempo [min]

Figura 9

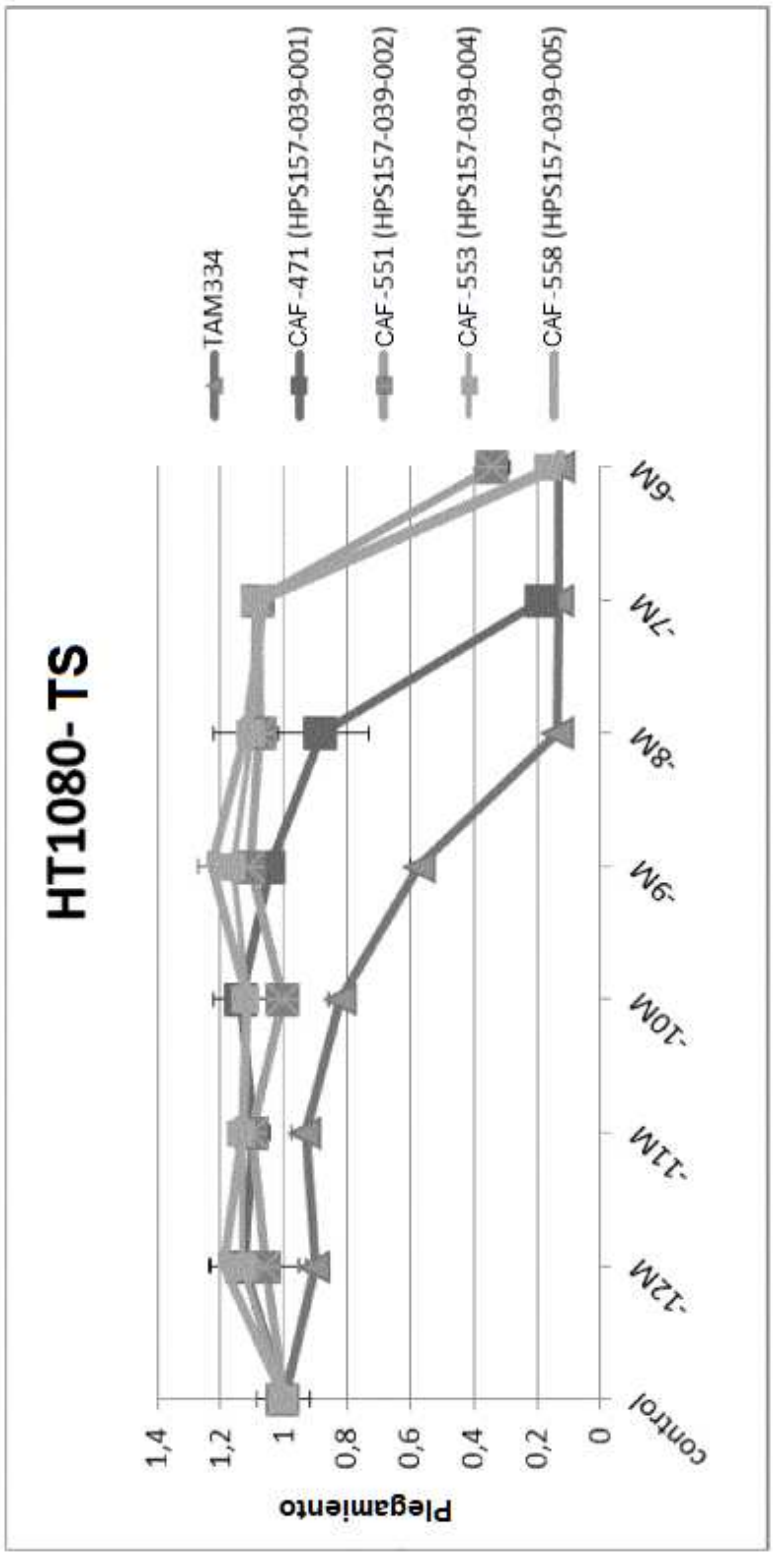

HT1080- TS
TAM334
CAF-471 (HPS157-039-001)
CAF-551 (HPS157-039-002)
CAF-553 (HPS157-039-004)
CAF-558 (HPS157-039-005)
Plegamiento
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
control
-12M
-11M
-10M
-9M
-8M
-7M
-6M

Figura 10A

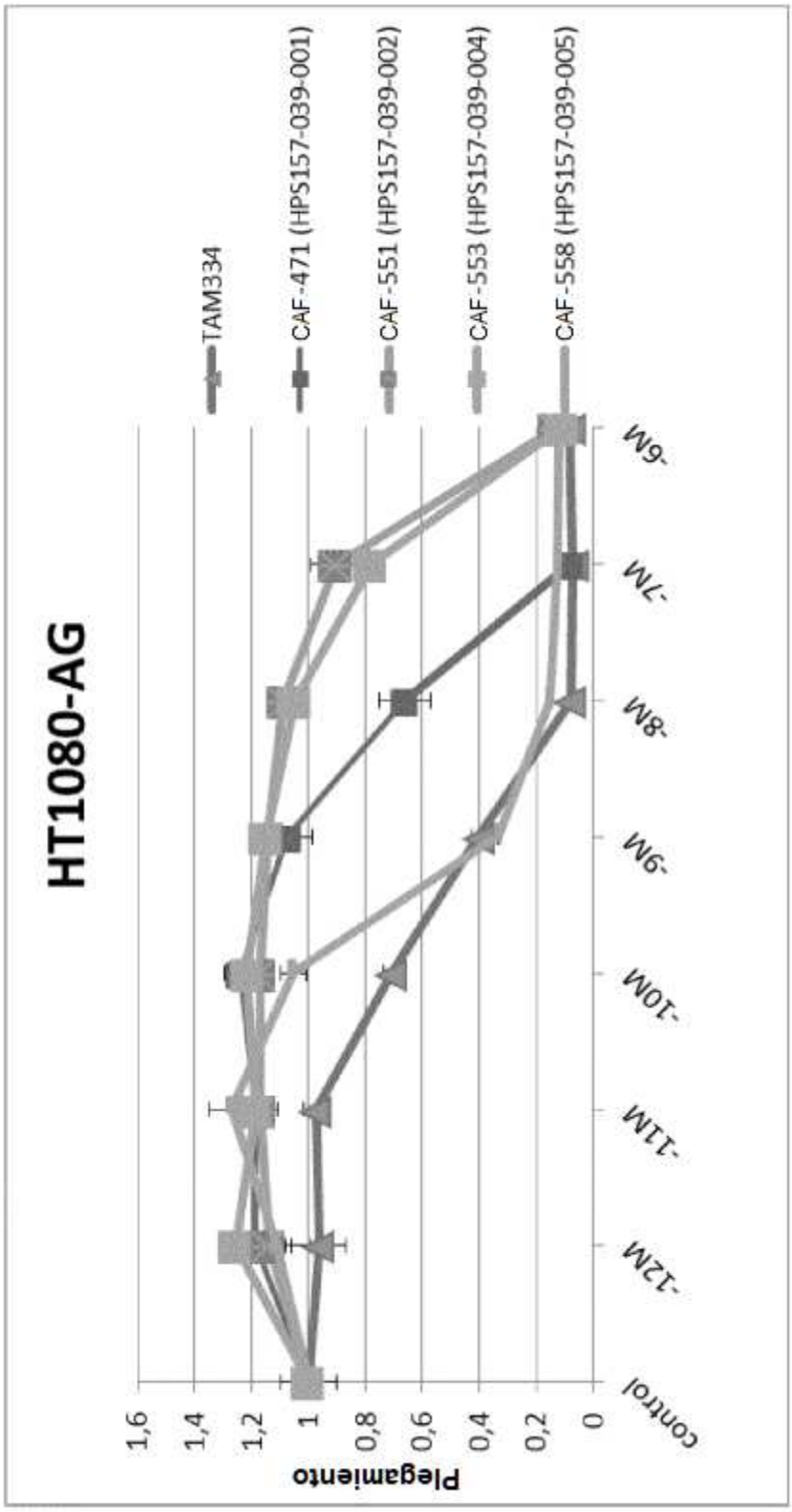

HT1080-AG
TAM334
CAF-471 (HPS157-039-001)
CAF-551 (HPS157-039-002)
CAF-553 (HPS157-039-004)
CAF-558 (HPS157-039-005)
Plegamiento
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
control
12M
11M
10M
9M
8M
7M
6M

Figura 10B

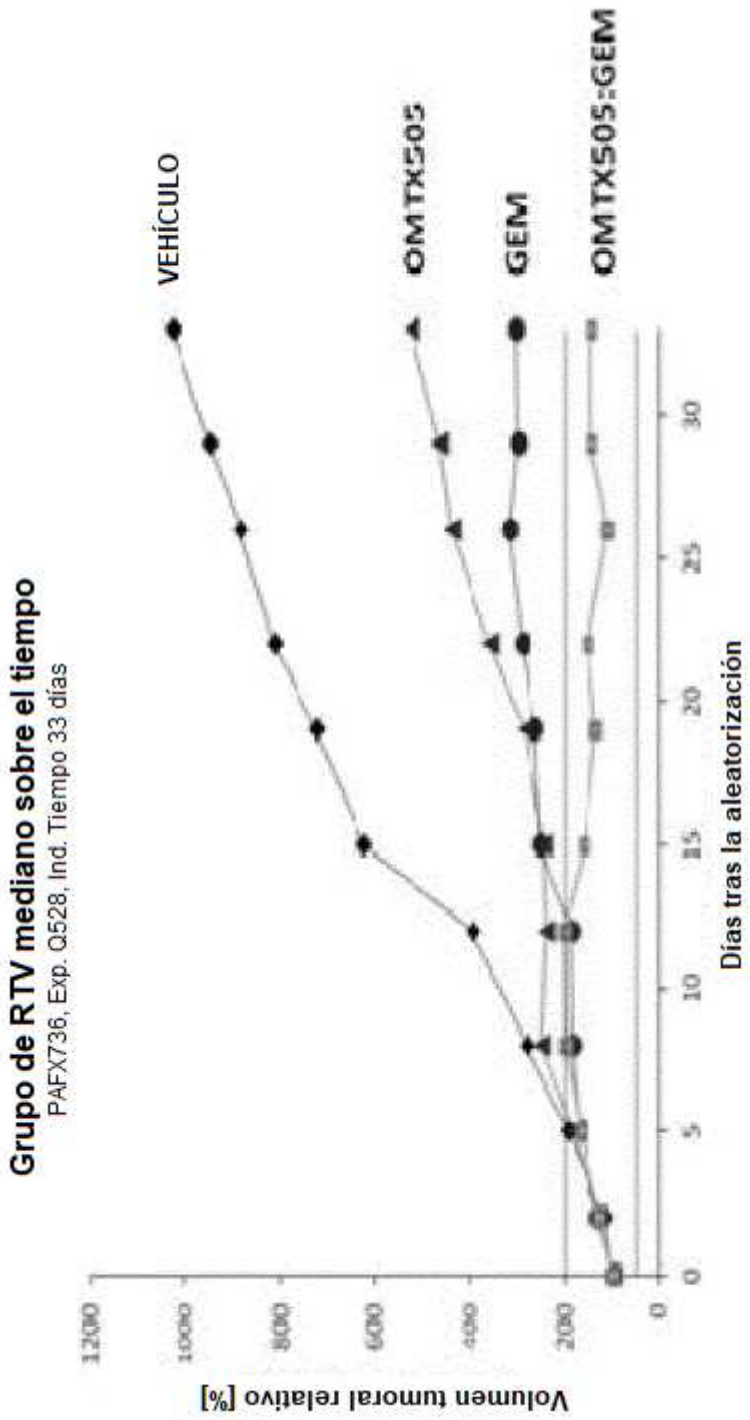

Grupo de RTV mediano sobre el tiempo
PAFX736, Exp. Q528, Ind. Tiempo 33 días
VEHÍCULO
OMTX505
GEM
OMTX505:GEM
Volumen tumoral relativo [%]
Días tras la aleatorización
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
0
5
10
15
20
25
30

Figura 11A

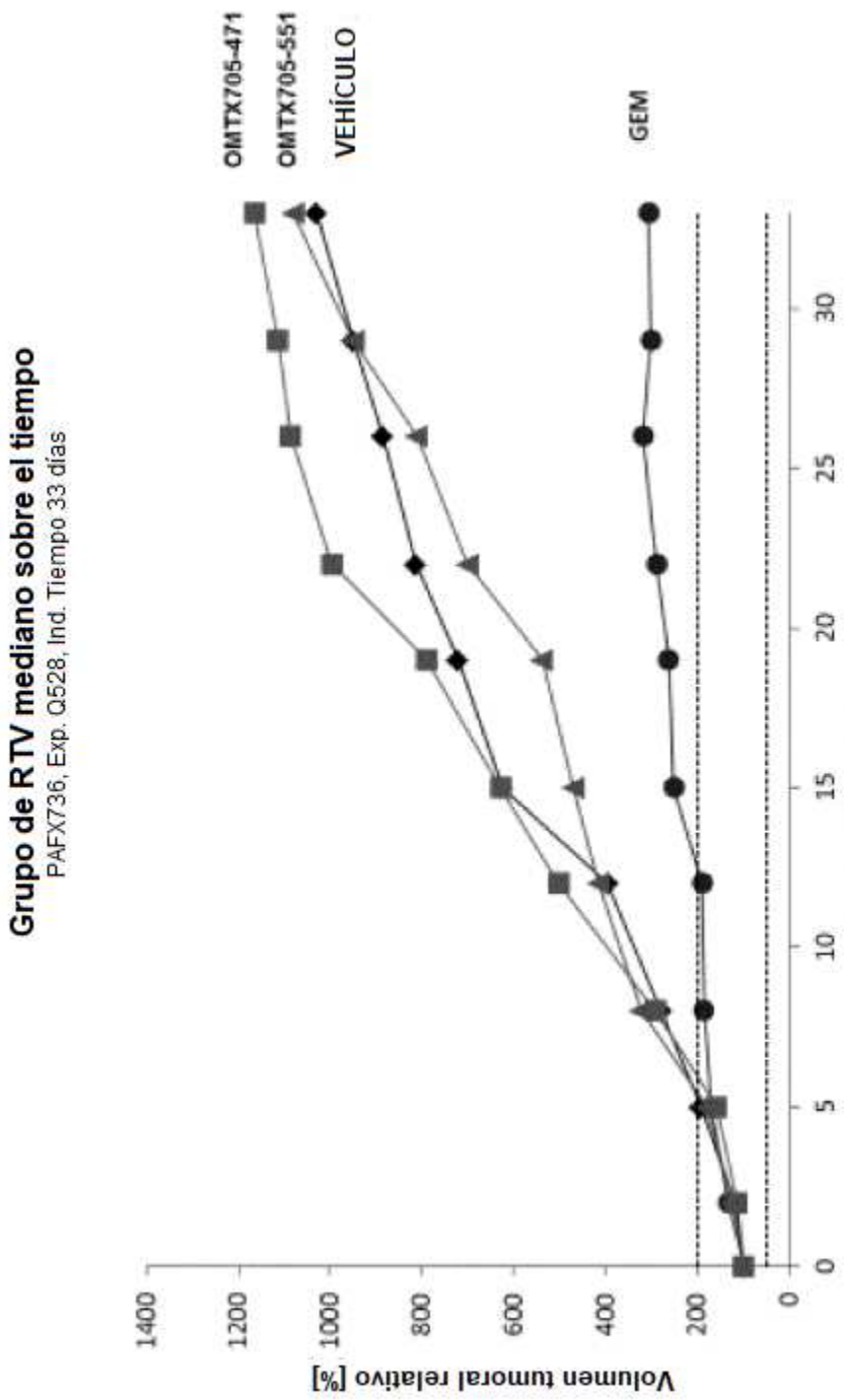

Grupo de RTV mediano sobre el tiempo
PAFX736, Exp. Q528, Ind. Tiempo 33 días
OMTX705-471
OMTX705-551
VEHÍCULO
GEM
Volumen tumoral relativo [%]
Días tras la aleatorización
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
0
5
10
15
20
25
30

Figura 11B

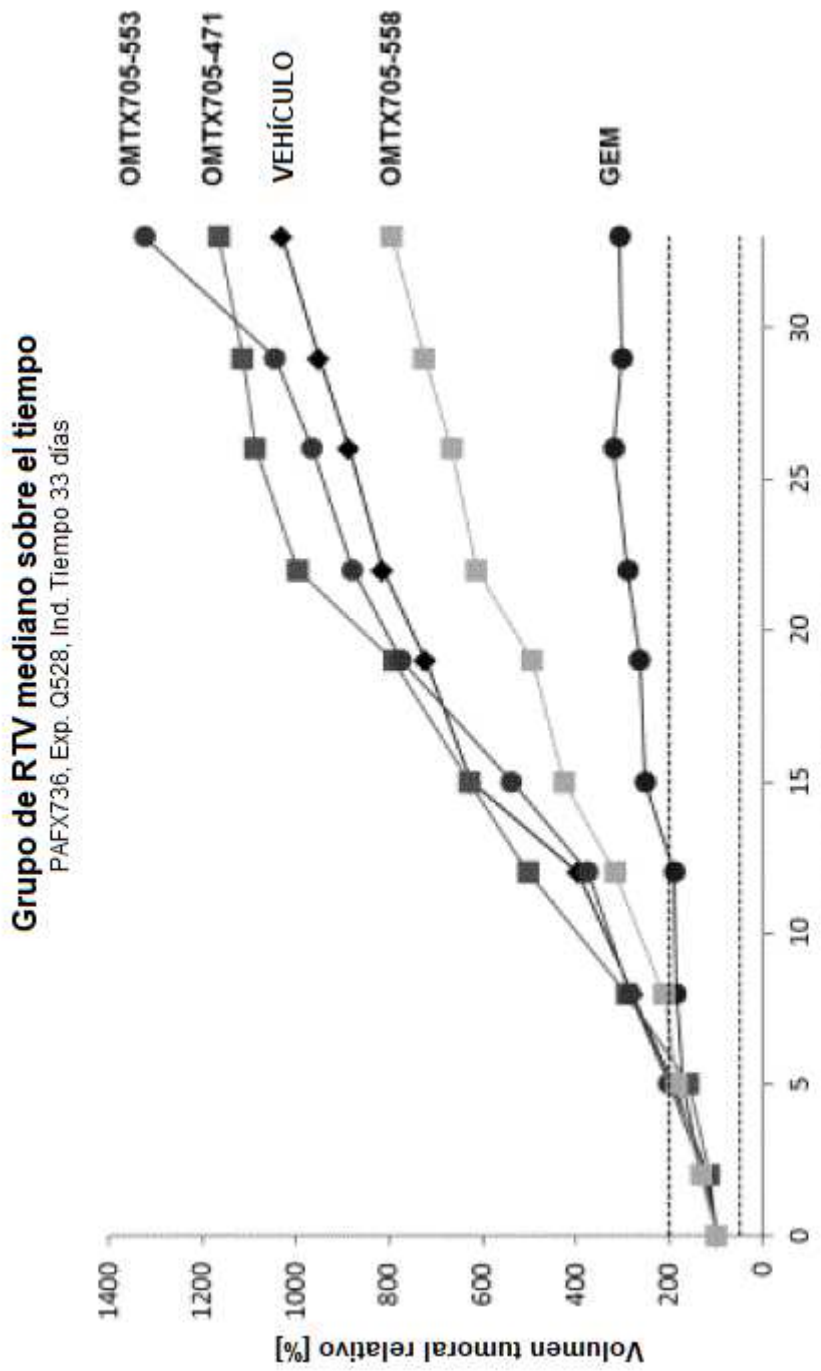

Grupo de RTV mediano sobre el tiempo
PAFX736, Exp. Q528, Ind. Tiempo 33 días
OMTX705-553
OMTX705-471
VEHÍCULO
OMTX705-558
GEM
Volumen tumoral relativo [%]
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
Días tras la aleatorización

Figura 11C