

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 445**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2011 PCT/EP2011/068126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2011 E 11770449 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2646465**

54 Título: **Generación de complejos polipeptídicos multifuncionales y multivalentes mediante el dominio de trimerización del colágeno XVIII**

30 Prioridad:

18.10.2010 EP 10382271
15.10.2010 EP 10382270

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2019

73 Titular/es:

LEADARTIS, S.L. (100.0%)
C/ Ferraz, 3 1º Izquierda
28008 Madrid, ES

72 Inventor/es:

ÁLVAREZ VALLINA, LUIS;
CUESTA MARTÍNEZ, ÁNGEL;
SÁINZ PASTOR, NOELIA y
SANZ ALCOBER, LAURA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 701 445 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

GENERACIÓN DE COMPLEJOS POLIPEPTIDICOS MULTIFUNCIONALES Y MULTIVALENTES MEDIANTE EL DOMINIO DE TRIMERIZACIÓN DEL COLAGENO XVIII**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5 La invención se refiere en general al diseño de complejos polipeptídicos triméricos. Utilizando polipéptidos que trimerizan mediante elementos estructurales derivados del colágeno XVIII y al menos un resto heterólogo unido covalentemente al extremo C-terminal de un polipéptido monómero que comprende dichos elementos de trimerización, y su uso en sistemas de diagnóstico y terapéuticos. La invención también se refiere a ácidos nucleicos y vectores útiles para producir dichos complejos polipeptídicos triméricos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La conversión de anticuerpos recombinantes monovalentes, como scFv (fragmentos variables de cadena simple), Fabs (fragmento de unión al antígeno) o anticuerpos de dominios únicos en formatos multivalentes aumentan la afinidad, disminuyen las tasas de disociación de unión a antígenos de la superficie celular y mejora la biodistribución [ver Cuesta AM et al. Trends Biotech. 2010, 28: 355-62].

20 La estrategia más común para crear anticuerpos multivalentes ha sido la ingeniería de proteínas de fusión en las que el fragmento de un anticuerpo forma un complejo con proteínas que generan homodimerización. Los anticuerpos diméricos recombinantes más relevantes son: El anticuerpo Fab₂ y su homólogo de una sola cadena, sc(Fab')₂ (Fab₂/sc (Fab)₂); el ZIP minianticuerpo (miniantibody), el anticuerpo scFv-Fc; y el minicuerpo (minibody). El minianticuerpo es una molécula de 64 kDa generada por la asociación de dos fragmentos scFv mediante los dominios de dimerización de las cremalleras de leucina (Fos o Jun) que se emplean para mediar la dimerización de los scFv en una molécula de minianticuerpo Fos-Fos y Jun-Jun. La formación de homodímeros permite una eficiente producción de minianticuerpos monoespecíficos estables y secretados. La formación de heterodímeros Fos-Jun permite la producción de minianticuerpos biespecíficos. El anticuerpo scFv-Fc es un pequeño anticuerpo recombinante de tipo IgG (100-105 kDa) generado por fusión de un scFv con la región bisagra de la IgG1 humana y regiones Fc (dominios C_H2 y C_H3). El minicuerpo (80 kDa) resulta de la fusión de un scFv con el dominio de C_H3 de la IgG1 humana. Otro tipo de minicuerpos se han generado utilizando mediante la técnica de inmunoproteínas pequeñas, o por fusión a la fosfatasa alcalina bacteriana.

35 La multimerización se puede forzar acortando el enlazador peptídico entre los dominios del scFv que se auto asocian en un dímero (diacuerpo/diobody; 55 kDa). Derivados adicionales del diacuerpo son el triacuerpo (triobody) y el tetracuerpo (tetrabody), que se pliegan en fragmentos triméricos y tetraméricos acortando el enlazador a menos de 5 o a 0-2 residuos, respectivamente. Un diseño diferente es el 'bispecific T cell engager' (BITE). Los BITES son anticuerpos biespecíficos de cadena simple que consisten en dos fragmentos de anticuerpos scFv, unidos a través de un conector flexible que se dirige contra un antígeno de superficie en las células diana y CD3ε en las células T.

40 Dominios de oligomerización de proteínas no-IgG se han utilizado para hacer anticuerpos multivalentes (es decir, construcciones moleculares basadas en la barnasa bacteriana-barstar módulo). La ribonucleasa barnase (12 kDa) y su inhibidor barstar (10 kDa) forman un complejo muy compacto y estable en el que los extremos N- y C-terminales son accesibles para la fusión de proteínas. Este módulo, que tiene una constante de disociación de alrededor de 10⁻¹⁴ M y ha sido explotado para generar scFv triméricos estables (alrededor de 130 kDa). Formatos similares han sido generados por fusión de un scFv a una citoquina que existe naturalmente en forma trimérica, como el factor de necrosis tumoral (TNFα). TNFα genéticamente unido al extremo C-terminal de un anticuerpo scFv forma una estructura homotrimérica que conserva tanto la actividad de TNFα como la capacidad de unirse al antígeno reconocido por el scFv. Además, fragmentos scFv fusionados con el dominio de multimerización de la proteína p53 supresora de tumores o con estreptavidina dan como resultado anticuerpos tetraméricos (scFv-SA)₄.

55 Otro enfoque exitoso para la generación de anticuerpos multiméricos ha sido el uso de dominios de oligomerización derivados de matriz extracelular. La trimerización se han logrado mediante proteínas heterólogas que contienen dominio (s) de colágeno (s) mediante el empleo de un dominio de trimerización homogéneo o heterólogo unido al dominio del colágeno para impulsar la formación de colágeno triple hélice. Ejemplos de trimeros mediante el uso de dominios de oligomerización incluyen un C-propéptido de procolágenos, una espiral coiled-coil, dominios de las proteínas de la familia de la colectina, una porción C-terminal de FasL y el dominio fibritin foldon del bacteriofago T4 [Frank et al., (2001) J Mol Biol 308: 1081-1089; Holler et al. (2003) Mol Cell Biol 23: 1428-1440; Hoppe et al., (1994) FEBS Lett 344: 191-195]. Un anticuerpo trimérico, collabody (125 kDa), se basa en el uso de colágenos formadores de tripletes como péptidos [(GPP)₁₀].

65 La fusión de la región de trimerización del dominio no colágeno C-terminal (NCI) del colágeno XVIII al extremo C-terminal de un scFv confiere un estado trimérico natural al anticuerpo fusionado (denominado Trimerbody; 110 kDa). El documento WO 2006/048252 describe proteínas de fusión que comprenden el fragmento scFv de un anticuerpo y el dominio NCI del colágeno XVIII, dicho dominio comprende el

dominio de trimerización y el dominio de endostatina homólogo (ES) unido por un péptido bisagra que contiene sitios sensibles a la proteinasa. Los constructos triméricos obtenidos son mono-específicos y trivalentes. Sánchez-Arevalo Lobo (2006, Int J Cáncer. 119: 455-62) describen proteínas de fusión de un anticuerpo y el dominio NCI del colágeno XVIII que comprende el dominio de trimerización y el dominio de endostatina.

Sin embargo, para ciertas aplicaciones, es conveniente que las moléculas sean multiespecíficas (es decir, bi-, tri-específicas o incluso superior) y / o multivalente (es decir, tetra-, penta-, hexa-valentes, o incluso superior). Para una avidéz completa de los anticuerpos multivalentes, todos los sitios de unión a antígenos deben estar ocupados. Cuando se dirigen a moléculas ligadas a la superficie celular, la orientación de los dominios de enlace o interacción en direcciones opuestas, pueden facilitar la unión simultánea de todos dominios al antígeno de superficie. La flexibilidad entre los sitios de unión a antígeno es otro aspecto importante en el diseño de anticuerpos multivalentes necesarios para entrecruzar los receptores de superficie en cualquiera de las células ya sean iguales o adyacentes. Cuando se produce una primera interacción, la posibilidad de establecer una segunda interacción efectiva antígeno-anticuerpo depende de la valencia, orientación espacial y flexibilidad del dominio de enlace. Múltiples eventos de enlace reducen las constantes de disociación de la interacción, aumentando así el tiempo de retención del anticuerpo interaccionado con su diana objetivo.

Para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas dirigidas a tumores, los anticuerpos multiespecíficos (es decir, tri-específicos, o incluso superior) y / o multivalentes (es decir, tetra-, penta-, hexa-valentes o incluso superior) serán más efectivos. En los enfoques de atrapamiento molecular, es importante aumentar el tamaño del anticuerpo por encima del umbral renal para retardar el aclaramiento de primer pase. Anticuerpos multiespecíficos y / o multivalentes o las versiones de receptores de membrana multivalentes truncados solubles (trampa múltiple) tendrían una mayor unión estequiométrica a citoquinas solubles y factores de crecimiento acoplado con tasas de disociación más lenta y mayor avidéz de los anticuerpos multivalentes se podría traducir en moléculas más solubles. Esto también se puede aplicar a otras partículas patógenas contra las que los anticuerpos se han generado como antídotos. Estos incluyen toxinas, como la neurotoxina A o el ántrax botulínico, toxinas y virus, como los virus de la hepatitis o el virus varicela zoster, en los cuales se ha demostrado que la multimerización es necesaria para una neutralización efectiva.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica anterior de proporcionar moléculas recombinantes que contienen un dominio de trimerización y que sean multiespecíficas y / o multivalentes.

Además, el documento EP 2065402 describe un scFv unido a un dominio de trimerización similar al dominio del colágeno que comprende repeticiones de GPP o GPO y se deriva del dominio de trimerización de mini-colágeno XXI y permite la unión la fusión de dominios de unión tanto para los extremos de forma individual como para ambos extremos simultáneamente, sin embargo, la estabilidad de dichos fragmentos de anticuerpos triméricos scFv-Col XXI parece no ser muy alta ya que su actividad biológica después de una incubación de 7 días en suero humano a 37 ° C. es aproximadamente 40% de la actividad inicial.

Sin embargo, la estabilidad en suero de los fragmentos de anticuerpos ingenierizados es un factor crítico como parámetro para determinar su potencial aplicación in vivo [Cuesta AM et al. Tends Biotechnology 2010, 28: 355-62].

Por lo tanto, también existe la necesidad en la técnica anterior de proporcionar moléculas recombinantes que contienen un dominio de trimerización y que tienen una estabilidad en suero apropiada.

Se ha encontrado ahora que la región de trimerización NCI del colágeno XVIII se puede utilizar para producir moléculas recombinantes C-terminales multiespecíficas y / o multivalentes funcionalmente activas abriendo así la posibilidad de hacer fácilmente moléculas recombinantes multiespecíficas multivalentes, con diferentes combinaciones de especificidad y valencia. Además, también se ha encontrado que las moléculas recombinantes que contienen la región de trimerización del colágeno XVIII tienen una estabilidad incrementada en suero con respecto a otros fragmentos de anticuerpos triméricos.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Representación esquemática de algunos ejemplos ilustrativos, no limitativos de complejos de polipéptidos triméricos (TPCs) que comprenden el elemento estructural de trimerización del colágeno XVIII (XVIIIITSE) proporcionado por la invención: TPCs mono- y bi- específicos C-terminales trivalentes, TPCs mono- y bi-específicos N-/C-terminales trivalentes; y TPCs mono- y bi-específicos hexavalentes N-/C-terminal monocadena, y algunas combinaciones TPCs de N-terminal, C-terminal y / o N-/C-terminal monocadena mono-específicos y biespecíficos.

Figura 2. Análisis de la presencia de complejos de polipéptidos triméricos (TPCs) funcionalmente activos N-terminal (L36-TN), C-terminal (OKT3-TC, L36-TC / OKT3-TC) o N-terminal y C-terminal (N / C) (L36-TN / OKT3-TC) en el sobrenadante de células HEK-293T modificadas genéticamente demostrado mediante transferencia de Western (A), ELISA (B) y citometría de flujo (C). (A) Los sobrenadantes puros se separaron mediante SDS-PAGE en geles de Tris-glicina al 4-20% y fueron electro-transferidos. Las proteínas se detectaron utilizando un mAb anti-etiqueta myc. Las distancias de migración de los marcadores de masa molecular están indicadas a la izda (kDa). (B) Análisis de la especificidad de los TPCs frente a laminina se demostraron mediante ELISA contra laminina inmovilizada en plástico. Las proteínas se detectaron usando un mAb anti-myc. Los niveles de detección de proteínas no son comparables debido a las diferencias en las cantidades de proteína expresada. (C) Análisis por citometría de flujo de la especificidad de unión de los TPCs a CD3 ϵ expresado en la superficie de Células T Jurkat humanas.

Figura 3. Análisis de la biespecificidad de complejos polipeptídicos triméricos (TPCs) N-terminal y N-/C-terminal trivalentes. (A) Actividades de unión de TPCs mono-específicos N-terminales (L36-TN, BI.8-TN), biespecífico N-terminal (BI.8-TN / L36-TN) y biespecíficos N-/C-terminal (BI.8-TN / L36-TC) se demostraron mediante ELISA contra Laminina inmovilizada en plástico y conjugados NIP-BSA. Las proteínas unidas se detectaron con un mAb anti-myc. (B) Biespecificidad del TPC biespecífico N-terminal (BI.8-TN / L36-TN) y biespecífico el TPC N-/C-terminal (BI.8-TN / L36-TC) se demostró mediante ELISA frente a laminina inmovilizada en plástico y la proteína TPC unida se detectó luego con NIP-BSA. Los TPCs enlazados/unidos fueron desarrollados utilizando un anticuerpo anti-BSA. Los niveles de detección de proteínas no son comparables debido a las diferencias en las cantidades de proteína expresada.

Figura 4. Análisis de la presencia de complejos polipeptídicos triméricos funcionalmente activos TPC N-terminal mono-específico (L36-TN), TPC C-Terminal (L36-TC), TPC N-/C-terminal (L36-TN / L36-TC) y TPC N-/ C-terminal monocadena (L36-T-L36) en el sobrenadante de las células HEK-293T modificadas. Se demostraron mediante transferencia de Western (A) y ELISA (B). (A) Los sobrenadantes puros se separaron mediante SDS-PAGE en geles de Tris-glicina al 4-20% y electrotransferencia. Las proteínas se detectaron utilizando un mAb anti-myc. Las distancias de migración de los marcadores de masa molecular están indicados a la izda (kDa). (B) Análisis de la especificidad de unión de los TPC a laminina se demostraron mediante ELISA frente a laminina inmovilizada en plástico.

Figura 5. Análisis de la presencia complejos polipeptídicos triméricos (TPCs) funcionalmente activos; TPC N-terminal mono-específico (L36-TN), TPC C-terminal (OKT3-TC), TPC N-/C-terminal monocadena mono-específico (L36-T-L36), TPC N-/C-terminal biespecífico (L36-TN / OKT3-TC), y TPC N-/C-terminal monocadena biespecífico (L36-T-OKT3) en el sobrenadante de células HEK-293T genéticamente modificadas se demostró mediante ELISA (A) y citometría de flujo (B). El análisis de la especificidad de unión del TPC a laminina se demostró mediante ELISA frente laminina inmovilizada en plástico. (B) Análisis por citometría de flujo de la unión. La especificidad del TPC a CD3 ϵ se analizó expresado en la superficie de las células T Jurkat humanas.

Figura 6. Análisis de la estabilidad en suero del TPC N-terminal mono-específico purificado (L36-TN) (círculo rellenos) después de la incubación a 37 °C en suero humano. Las mezclas indicadas de reacción fueron analizadas por ELISA frente a Laminina inmovilizada en plástico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE EL INVENTO

Los inventores han encontrado que un elemento estructural trimerizante del colágeno XVIII (XVIIIITSE) forma, sorprendentemente moléculas recombinantes multiespecíficas y / o multivalentes especialmente activas que tienen una mayor estabilidad en suero, abriendo así la posibilidad de hacer fácilmente moléculas multiespecíficas, multivalentes, recombinantes con diferentes combinaciones de especificidad y valencia y mayor estabilidad en suero. Por lo tanto, las moléculas recombinantes pueden encontrar muchas aplicaciones en el campo tanto de la terapia como del diagnóstico.

Así, en un aspecto, la invención se refiere a un complejo polipeptídico trimérico, en lo sucesivo denominado "complejo polipeptídico trimérico de la invención" o "TPC" de la invención o en plural "TPCs" de la invención, que comprende tres monómeros polipéptidos, donde (i) cada uno de dichos polipéptidos monómeros comprende un elemento estructural de trimerización del colágeno XVIII (XVIIIITSE), en el que dicho XVIIIITSE comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID NO: 1 o una variante equivalente de la misma que tiene la capacidad de formar trímeros, en donde dicha variante equivalente de la misma muestra un grado de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1 de al menos 30%, y (ii) al menos el polipéptido de uno de dichos monómeros está unido covalentemente al menos a un resto heterólogo, en el que el resto heterólogo se coloca en el extremo C-terminal con respecto a dicho polipéptido monómero; es decir, el resto heterólogo está unido covalentemente al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero.

Como se usa en el presente documento, el término "elemento estructural de trimerización colágeno XVIII" o "XVIIIITSE", se refiere a la región del colágeno XVIII, que es responsable de la trimerización no covalente entre monómeros de colágeno XVIII. El XVIIIITSE está enmarcado en la parte N-terminal por el dominio central de triple hélice del colágeno XVIII y en la C-terminal por la región bisagra sensible a la proteasa y el dominio globular de la endostatina. El término también pretende abarcar variantes funcionalmente equivalentes del XVIIIITSE de una forma natural del colágeno XVIII, variantes que han sido modificadas en la secuencia de aminoácidos sin afectar negativamente, en ningún grado sustancial, las propiedades relativas a la trimerización de la molécula del colágeno XVIII nativo. Dichas modificaciones incluyen, la sustitución conservativa (o no conservativa) de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos, la inserción y / o la eliminación de uno o más aminoácidos, siempre que las propiedades de trimerización de la proteína del colágeno XVIII nativo sean mantenidas sustancialmente, es decir, la variante mantiene la capacidad funcional de formar trímeros con otros péptidos que tienen la misma secuencia en condiciones fisiológicas, es decir, condiciones que permiten la expresión de proteínas in vivo en el citosol de un organismo eucariota o procariota donde la capacidad de una variante equivalente para formar trímeros se puede determinar por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, a modo de ilustración simple, la capacidad de una variante equivalente para formar un trímero se puede determinar utilizando técnicas cromatográficas estándar. Por lo tanto, la variante a evaluar se somete a condiciones de trimerización adecuadas y el complejo se somete a un ensayo cromatográfico estándar en condiciones no desnaturalizantes. Condiciones para que el complejo finalmente formado (trímero) no se altere. Si la variante trimeriza correctamente, el tamaño molecular del complejo sería tres veces más pesado que el tamaño molecular de una sola molécula de la variante. El tamaño molecular del complejo se puede revelar mediante el uso de métodos estándar, como la centrifugación analítica, espectrometría de masas, cromatografía de exclusión por tamaño, velocidad de sedimentación, etc.

Aunque dicho XVIIIITSE puede derivarse virtualmente de cualquier organismo, en una particular realización dicho sujeto es un mamífero tal como un ratón, rata, mono, etc. preferiblemente un ser humano. Así, en una realización particular, el XVIIIITSE se deriva a partir del colágeno humano XVIII. Especialmente preferido es un polipéptido monómero que comprende al menos un XVIIIITSE derivado del colágeno humano XVIII. En una realización particular, dicho XVIIIITSE consiste en, o comprende, la región N-terminal de trimerización del colágeno XVIII del dominio NCI, como la región que comprende desde el residuo 1207 hasta el residuo 1336 de colágeno humano XVIII, preferiblemente del residuo 1208 al residuo 1266 [Takako S. et al. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *The EMBO Journal* Vol.17 No.15 pp.4249—4256, 1998; and Boudko, S.P., et al., Crystal Structure of Human Collagen XVIII Trimerization Domain: A Novel Collagen Trimerization Fold, *J. Mol. Biol.* (2009), doi:10.1016/j.jmb.2009.07.057].

En otra realización particular, el XVIIIITSE es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 1 o una variante equivalente del mismo, es decir, un péptido derivado del péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEC ID NO: 1 mediante modificación, inserción y / o eliminación de uno o más aminoácidos, siempre que la propiedad de trimerización del colágeno nativo XVIII, a saber, de su dominio NCI, se mantiene sustancialmente, es decir, la variante equivalente mantiene la capacidad del péptido cuya secuencia de aminoácidos es mostrada en la SEC ID NO: 1 de trímeros formadores con otros péptidos que tienen el mismo dominio de trimerización en condiciones fisiológicas. La habilidad funcional de la variante equivalente para formar trímeros se puede determinar por métodos convencionales como hemos discutido anteriormente.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de variantes equivalentemente equivalentes son aquellos que muestran un grado de identidad con respecto al péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NO: 1 igual o superior al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por cualquier método convencional, por ejemplo, por medio de algoritmos de alineación de secuencia estándar conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST [Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5; 215(3):403-10]. En una realización particular, el XVIIIITSE es una variante equivalente del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. NO: 1, dicha variante equivalente tiene al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia mostrada en SEC ID NO: 1.

En una realización particular, dicho XVIIIITSE comprende:
 a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 1, o
 b) un polipéptido que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 1, y mantiene la capacidad de formar trímeros.

En una realización particular, el XVIIIITSE comprende, o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 1.

En otra realización particular, el XVIIIITSE comprende, o consiste en, un polipéptido con al menos 60% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, normalmente al menos el 70%, generalmente al menos el 80%, ventajosamente al menos 90%, más ventajosamente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos el 97%, aún más preferiblemente al menos el 98% o incluso más preferiblemente al menos el 99%, y tiene la capacidad de formar trimeros.

El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos referidas en esta descripción pueden ser modificada químicamente, por ejemplo, por medio de modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

Se ha encontrado que el XVIIIITSE se puede utilizar para producir, entre otros complejos de polipéptidos triméricos (TPC), mono- y bi- específicos funcionalmente activos, TPC C-terminales trivalentes, TPC N-/C- terminales mono- y bi-específicos trivalentes; y TPC N-/C-terminal monocadena mono- y bi-específicos hexavalentes [ver Figura 1, que muestra una representación esquemática de dichos ejemplos ilustrativos, no limitativos, de TPCs de la invención y Ejemplo 1]. Adicionalmente, se ha encontrado que el XVIIIITSE se puede utilizar para producir TPCs C-terminales mono-específicos funcionalmente activos con un anticuerpo monodominio (VHH) como dominio de unión a ligando o con un factor de crecimiento (por ejemplo, VEGF). Por lo tanto, la presente invención abre la posibilidad de hacer fácilmente moléculas recombinantes multi-específicas (por ejemplo, bi-, tri-, tetra-específicas, etc.), multivalentes (por ejemplo, divalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes o hexavalentes) que tienen diferentes combinaciones de especificidad y valencia. Sólo a modo ilustrativo, para la orientación a tumores, aplicaciones diagnósticas o terapéuticas, TPCs multiespecíficos (es decir, bi-, tri-específicas, o incluso multivalentes (es decir, tetra, penta, hexavalente o incluso superiores) se espera sean más efectivos. En los enfoques de captura molecular, es importante aumentar el tamaño del anticuerpo multiespecífico y / o anticuerpos multivalentes por encima del umbral renal para retardar las tasas de aclaramiento o versiones trivalentes solubles multivalentes de receptores de membrana (trampa múltiple) tendría un aumento de la estequiometría de unión a citoquinas solubles y factores de crecimiento. Junto con las tasas de eliminación disminuidas, la mayor avidéz de los anticuerpos multivalentes se puede traducir en moléculas más solubles. Esto también se puede aplicar a otras partículas patógenas contra las que se han generado antídotos basados en anticuerpos. Estas incluyen toxinas, como la neurotoxina A, botulínica, toxina del ántrax y virus, como virus de la hepatitis, varicela-zoster, en los que se ha realizado multimerización demostrado ser necesario para la neutralización efectiva.

Por el término "resto heterólogo" se entiende aquí cualquier entidad química que pueda estar fusionada o enlazada covalentemente a un XVIIIITSE y al cual el XVIIIITSE no es nativo covalentemente unido. Dado que la endostatina es un fragmento C-terminal de 20 kDa que se produce naturalmente derivado del colágeno tipo XVIII, el experto en la materia entenderá que se excluye el dominio de endostatina, en la medida en que está ligada de forma nativa al XVIIIITSE, de ser considerada como un resto heterólogo como se define en el presente documento; es decir, el dominio murino de endostatina se consideraría como un resto no heterólogo (u homólogo) de acuerdo con la presente invención, si está fijada o covalentemente unida a un XVIIIITSE murino, sin embargo dicho dominio de endostatina murina sería considerado como un resto heterólogo de acuerdo con la presente invención si está fusionado o unido covalentemente a un XVIIIITSE que no sea un XVIIIITSE murino; del mismo modo, un dominio de endostatina humana sería considerado como un resto no heterólogo de acuerdo con la presente invención si está fusionada o unida covalentemente a un XVIIIITSE humano, sin embargo dicho dominio de la endostatina humana sería considerado como un resto heterólogo de acuerdo con la presente invención si está fijada o unida covalentemente a un XVIIIITSE distinto de un XVIIIITSE humano. Por lo tanto, en una realización particular, si el resto heterólogo es la endostatina, entonces el XVIIIITSE y la endostatina no pertenecen a la misma especie, es decir, si la porción homóloga es la endostatina humana, entonces XVIIIITSE no es humano (es decir, el XVIIIITSE puede ser de una especie distinta de la humana, por ejemplo, murino, etc.), o si el resto homólogo es endostatina murina, entonces el XVIIIITSE no es murino (es decir, el XVIIIITSE puede ser de una especie más que murino, por ejemplo, humano, etc.) y similares.

La secuencia de aminoácidos de la endostatina murina se muestra en la SEC ID NO: 19; por lo tanto, en una realización particular, el resto heterólogo no es, o no comprende, la proteína de la SEC ID NO: 19 cuando el XVIIIITSE es un XVIIIITSE murino (es decir, comprende el dominio de trimerización del colágeno de la proteína XVIII murino).

La secuencia de aminoácidos de la endostatina humana se muestra en la SEC ID NO: 20; por lo tanto, en una realización particular, el resto heterólogo no es, o no comprende, La proteína de la SEQ. ID. NO: 20 cuando el XVIIIITSE es un XVIIIITSE humano (es decir, comprende el dominio de trimerización del colágeno XVIII humano).

En otra realización particular, el resto heterólogo no es endostatina humana, es decir, un fragmento C-terminal de 20 kDa que se produce naturalmente derivado del colágeno de tipo XVIII de una especie, en

particular, la proteína de la SEC ID NO: 19 o la SEC ID NO: 20. Sin embargo, en otra realización particular, el resto heterólogo es una endostatina recombinante (no nativa), es decir, un fragmento C-terminal de 20 kDa de origen no natural derivado del colágeno tipo XVIII, por ejemplo, variantes o fragmentos de endostatina que mantienen al menos una capacidad funcional de la endostatina nativa, por ejemplo, su capacidad para bloquear la proliferación y organización de células endoteliales en nuevos vasos sanguíneos o inhibir angiogénesis y crecimiento de tumores primarios y metástasis secundarias en animales.

Por lo tanto, en una realización particular, el resto heterólogo es un polipéptido con al menos un 83% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 20, con la condición de que dicho polipéptido no sea la proteína de la SEC ID NO: 20, y mantiene al menos una actividad biológica de una endostatina, por ejemplo, la capacidad para bloquear la proliferación y organización de células endoteliales en vasos sanguíneos nuevos o inhiben la angiogénesis y el crecimiento de ambos tumores primarios y secundarios o metástasis en estudios en animales. Ensayos para evaluar la capacidad de un polipéptido para bloquear in vitro la proliferación y organización de las células endoteliales en nuevos vasos sanguíneos han sido divulgados, por ejemplo, por Folkman, J. & Kalluri, R. (2004). "Cancer without disease; mientras que los ensayos para evaluar la capacidad de un polipéptido para inhibir la angiogénesis y el crecimiento de ambos tumores primarios y secundarios las metástasis en estudios con animales han sido reveladas, por ejemplo, por O'Reilly, M.S. et al. J. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth". *Cell* 88 (2):277—85. Por lo tanto, en una realización particular, el resto heterólogo comprende, o consiste en un polipéptido que tiene al menos un 83% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 20, distinta del péptido de la SEC ID NO: 20, normalmente al menos el 85%, generalmente al menos el 90%, ventajosamente al menos el 95%, preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97%, aún más preferiblemente al menos el 98% o incluso más preferiblemente 99%, y tiene la capacidad de bloquear la proliferación y organización de las células endoteliales en nuevos vasos sanguíneos o para inhibir la angiogénesis y el crecimiento de ambos tumores primarios y metástasis secundarias en estudios en animales.

Otros ejemplos ilustrativos, no limitativos, de endostinas mutantes que pueden ser utilizados en el contexto de la presente invención incluyen los descritos por Shin Su et al., "Targeted delivery of an antibody-mutant human endostatin fusion protein results in enhanced antitumor efficacy", *Mol Cancer Ther.* 2011 Apr;10(4):603-14. Epub 2011 Mar 10; Subramanian IV et al., "Adeno-associated virus-mediated delivery of a mutant endostatin in combination with carboplatin treatment inhibits orthotopic growth of ovarian cancer and improves long-term survival", *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):43 19- 28; and Yokoyama Y & Ramakrishnan B., "Addition of integrin binding sequence to a mutant human endostatin improves inhibition of tumor growth", *Int J Cancer.* 2004 Oct 10;111(6):839-48.

En general, el resto heterólogo puede ser cualquier resto asociado de forma covalente conocido en la técnica para proporcionar propiedades deseadas de unión, detección o efectoras. Ejemplos ilustrativos, no-limitativos, de ejemplos de restos heterólogos incluyen, además de las endostatinas variantes mencionadas anteriormente, las siguientes:

- a) una estructura de unión a ligando, tal como una molécula receptora, el ligando o la parte de unión de una molécula receptora, como por ejemplo una forma truncada del receptor del factor endotelial vascular (VEGFR); un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, o una molécula que tiene características de anticuerpo, como, por ejemplo, un fragmento variable (Fv) de una sola cadena. (scFv), un diacuerpo, un anticuerpo monodominio (VH), un nanocuerpo (VHH), moléculas derivadas de los llamados formatos alternativos de anticuerpos, tales como DARPin, anticalins, affibodies, adnectins, finomers, affilins, affitins, avimeros, monobodies, minianticuerpos, etc., u otro ligando vinculante de moléculas tales como avidina, estreptavidina o lectinas, etc ;
- b) secuencias de péptidos naturales y / o de ingeniería tanto en formas lineales como cíclicas, tales como estructuras peptídicas bicíclicas (anticuerpos 'miniaturizados');
- c) una toxina como la ricina, la exotoxina A de *Pseudomonas*, etc ;
- d) una etiqueta detectable tal como una molécula marcada con fluorescencia, una molécula marcada radiactivamente o un etiquetado mediante una molécula enzimática;
- e) una sustancia activable in situ, como una molécula que puede ser inducida por un campo magnético o por radiación para ser radioactivamente o químicamente activa;
- f) una enzima tal como la peroxidasa, etc .;
- g) un resto radioactivo tal como una molécula que emita radiación gamma, alfa, beta- o beta+, por ejemplo, una molécula que comprende uno o más isótopos radiactivos seleccionados de ^{14}C , ^3H , ^{32}F , ^{33}F , ^{25}S , ^{38}S , ^{36}Cl , ^{22}Na , ^{24}Na , ^{40}K , ^{42}K , ^{43}K , y cualquier otro isótopo utilizado convencionalmente con el fin de facilitar la detección de sondas o con el propósito de proporcionar radiación localizada para efectuar la muerte celular;
- h) una citoquina como un interferón, una interleucina (por ejemplo, interleucina 12, etc.), un leucotrieno, un factor de crecimiento angiogénico como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) etc .;

- i) un inhibidor de la angiogénesis como la endostatina (con las condiciones mencionadas anteriormente), angiostatina, restin, etc.;
- j) un ácido nucleico peptídico (PNA);
- k) un polímero no proteico tal como un alcaloide polimérico;
- 5 l) un polialcohol;
- m) un polisacárido;
- n) un lípido;
- o) una poliamina;
- p) una porción de foto-reticulación, es decir, una entidad química que efectúa reticulación tras
- 10 fotoactivación;
- q) un grupo que facilita la conjugación del polipéptido monómero a una diana objetivo; o
- r) una etiqueta con el fin de facilitar el aislamiento y purificación del TPC de la invención, por ejemplo, una etiqueta de afinidad para la purificación tal como un péptido etiqueta; ilustrativo, no limitativo ejemplos de dichas etiquetas incluyen secuencias de poli-histidina [poli His], secuencias peptídicas capaces de ser
- 15 reconocidas por anticuerpos que pueden ser utilizados para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, epítomos derivados de la hemaglutinina del virus de la fiebre, la etiqueta c-myc, la etiqueta estreptocócica, etc.

En una realización particular, dicho resto heterólogo es un anticuerpo, en cualquier formato, por ejemplo un anticuerpo monoclonal (mAb), o un fragmento recombinante del mismo, por ejemplo, un fragmento Fv de una sola cadena (scFv), un anticuerpo de un solo dominio, etc. En una particular realización, dicho

20 resto heterólogo es un anticuerpo, en cualquier formato, que reconoce un marcador angiogénico, por ejemplo, laminina, un componente de la matriz extracelular (ECM), como el anticuerpo anti laminina L36 (Ejemplo 1) que contiene la región variable de la cadena pesada (VH) presenta un enlazador flexible, como (Gly₄Ser)₃ [SEQ ID NO: 3] fusionado a la región variable de la cadena ligera (VL) cuya secuencia se ha descrito previamente [Sanz L et al. Cancer Immunology and Immunotherapy, 2001 Dec; 50 (10):557-65], en donde el extremo N-terminal de dicho L36 scFv está vinculado al extremo C-terminal de dicho XVIIIITSE, es decir, a la región C-terminal del dominio NCI de trimerización del colágeno humano XVIII, a través de un espaciador peptídico flexible. El anticuerpo L36 reconoce lamininas de diferentes

30 especies animales, por ejemplo, de ratones, ratas, humanos, etc., ya que interactúa con una región que está preservada entre diferentes especies animales [Sanz L et al. EMBO J 2003, vol. 22 (7): 1508-1517].

En otra realización particular, dicho resto heterólogo es un anticuerpo, en cualquier formato, frente a un marcador presente en la sangre de una célula, por ejemplo, una molécula expresada en el superficie de una célula leucocitaria, por ejemplo, un antígeno de diferenciación también denominado CD (es decir, cualquiera de una serie de superficies celulares) marcadores expresados por leucocitos y utilizados para distinguir linajes celulares, etapas de desarrollo y subconjuntos celulares definidos; tales marcadores pueden ser identificados por anticuerpos monoclonales. En una realización particular, dicha célula leucocitaria es un linfocito (es decir, un tipo de glóbulo blanco del sistema inmunitario de los vertebrados), como una célula T o linfocito T. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos anti-CD3ε, OKT3, un anticuerpo que reconoce CD3ε, un marcador de linfocitos T, por ejemplo, como un scFv (Ejemplo 1) que contiene la región de cadena pesada variable (VH) fusionada con un enlazador flexible, a saber (Gly₄Ser)₃ [SEC ID NO: 3] a la región variable de la cadena ligera (VL), en donde el extremo N-terminal de dicho OKT3 scFv [Holliger P. et al. Carcinoembryonic Antigen (CEA)-specific T-Cell Activation in Colon Carcinoma Induced by Anti-CD3xAnti-CEA Bispecific Diabodies and B7xAnti-CEA Bispecific Fusion Proteins. Cancer Res. (1999) 59, 2909-16] está fusionado al extremo C-terminal de dicho XVIIIITSE de la región de trimerización NCI del colágeno humano XVIII, a través de un espaciador de péptidos flexible [SEC ID NO: 4]. Otros ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos anticuerpos incluyen Anticuerpos anti-CD4 (p. ej., Clenoliximab, Keliximab, Zanolimumab, etc.), anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, efalizumab, etc.), anticuerpos anti-CD18 (por ejemplo, erlizumab, etc.), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, Ofatumumab, Ocrelizumab, Pascolizumab, etc.), anticuerpos anti-CD23 (por ejemplo, Lumiliximab, etc.), anticuerpos anti-CD40 (por ejemplo, Teneliximab, Toralizumab, etc.), anticuerpos anti-CD62L / L-selectina (por ejemplo, Aselizumab, etc.), anticuerpos anti-CD80 (por ejemplo, Galiximab, etc.), anticuerpos anti-CD147 / Basigin (por ejemplo, Gavilimumab, etc.), anticuerpos anti-CD154 (por ejemplo, Ruplizumab, etc.), anticuerpos anti-BLyS (B-Estimulador de linfocitos) (por ejemplo, Belimumab, etc.), anticuerpos anti-CTLA-4 (por ejemplo, Ipilimumab, Tremelimumab, etc.), anticuerpos anti-eotaxin-1 (por ejemplo, Bertilimumab, Lerdelimumab, Metelimumab, etc.), anticuerpos anti-integrina (por ejemplo, Natalizumab, etc.), Anticuerpos anti-interleucina-6 (por ejemplo, Tocilizumab, etc.), anticuerpos anti-LFA-1 (por ejemplo, Odulimumab, etc.), anticuerpos anti-receptor de IL-2 / CD25 (por ejemplo, basiliximab, Dacizumab, inolimumab, etc.), etc.

Como agonistas de receptores de superficie celular, el TPC de la invención que puede ser adecuado para receptores que se trimerizan tras la unión del ligando, como los receptores de la familia TNF (CD134, CD40, FAS, CD27, CD30 o CD137). Miembros de la familia TNF que carecen de dominios de muerte y que en las respuestas de las células T proporcionan señales inmunes coestimuladoras. La reticulación o entrecruzamiento de este tipo de receptores es esencial para la señalización intracelular [Watts, TH. (2005) TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. Annu. Rev. Immunol. 23, 23-68;

and Zhou, Z. et al. (2008) Human glucocorticoid-induced TNF receptor ligand regulates its signaling activity through multiple oligomerization states. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105, 5465-5470], and in vitro activation of these receptors requires oligomerization of their ligands [Wyzgol, A. et al. (2009) Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. J. Immunol. 183, 1851-1861]. Uno de tales receptores es CD134, también conocido como OX40, que estimula potentemente las células T y potencialmente inhibe las células T reguladoras o Treg [Gough, M.J. et al. (2008) OX40 agonist therapy enhances CD8 infiltration and decreases immune suppression in the tumor. Cancer Res. 68, 5206-5215]. Otro receptor / ligando similar son los sistemas de CD40 y CD137. En otra realización particular, la parte heteróloga del TPC de la invención es un anticuerpo, en cualquier formato, contra CD134, CD40, FAS, CD27, CD30 o CD137. Los complejos triméricos pueden tener una eficiencia superior como agonistas de dichos receptores, ya que muestran conformaciones que permiten la unión de tres receptores, lo que provoca la activación y señalización de un subconjunto más grande de receptores.

En otra realización particular, dicho resto heterólogo es un anticuerpo, en cualquier formato que reconoce un antígeno asociado a tumor (TAA), es decir, un antígeno adquirido por la célula tumoral o en proceso de transformación neoplásica. Ejemplos ilustrativos, no limitativos incluyen dichos anticuerpos anti-TAA como anti-CEA (antígeno carcinoembrionario) (p. ej., anticuerpo MFE-23, etc.), anticuerpos anti-TAG-72 (glicoproteína asociada a tumor 72), anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti-CD52, anticuerpos anti-CD30, anticuerpos anti-CD33, anticuerpos anti-CD44v6, anticuerpos anti-CD45, Anticuerpos anti-FBP (proteína de unión a folato), anticuerpos anti-EGP-40 (glicoproteína epitelial 40), anticuerpos anti-gangliósidos (GD3), anticuerpo frente al antígeno de carbohidrato anti-Lewis_y, anticuerpos anti receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), anticuerpos anti antígeno 125 (CA-125), anticuerpos anti-Mucina 1, anticuerpos frente a MUC1 o anticuerpos de mucina epitelial polimórfica (PEM), anticuerpos anti-idiotipo anti-linfoma B, anticuerpos anti idiotipo anti-linfoma T, anticuerpos anti-HMW-MAA (antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular), anticuerpos anti-alfa feto proteína (AFP), anticuerpos frente al antígeno selectivo de carcinoma de células renales (por ejemplo, anticuerpo G250, etc.); anticuerpos contra los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), como EGFR (ErbB-1), HER2 / c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4); anticuerpos contra EPCAM (Molécula de adhesión de células epiteliales), también se ha designado como TACSTDI (tumor transductor de señal de calcio asociado 1); anticuerpos anti-CD326; anticuerpos frente receptores de quimioquinas, etc.

En otra realización particular, dicho resto heterólogo es un anticuerpo, en cualquier formato frente a un marcador angiogénico, es decir, una proteína asociada con angiogénesis excesiva o inapropiada, por ejemplo, dominio extra-B que contiene la fibronectina (EDB (+) FN), tenascin-c, laminina, etc.

En otra realización particular, dicho resto heterólogo es un anticuerpo, en cualquier formato, para una proteína tumoral, es decir, una proteína expresada dentro de un contexto tumoral, por ejemplo, p32 / gClqR (Fogal V. et al. Mitochondrial/Cell-Surface Protein p32/gClqR as a Molecular Target in Tumor Cells and Tumor Stroma. Cancer Res. 2008 68:7210), etc.

En otra realización particular, dicho resto heterólogo es un anticuerpo en cualquier formato, frente a una partícula patógena, por ejemplo una toxina, como la neurotoxina botulínica A, toxina del ántrax, etc., un virus, como el virus de la hepatitis, varicela zoster, inmunodeficiencia (VIH), etc., en los cuales se ha demostrado que la multimerización es necesaria para una neutralización efectiva.

En otra realización particular, dicho resto heterólogo es un anticuerpo, en cualquier formato frente a un factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor angiogénico que estimula el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Otros ejemplos ilustrativos, no-limitativos de anticuerpos contra VEGF incluyen bevacizumab [Kim K et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. Nature. 1993. 362:841-4]. Dicho anticuerpo bloquea la actividad biológica de VEGF. Ejemplos ilustrativos adicionales, no limitativos, de dichos anticuerpos contra el factor de crecimiento incluyen anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral (TNF- α), anticuerpos para el factor de crecimiento transformador (TGF), por ejemplo, TGF- β 1, anticuerpos contra interferones (por ejemplo, IFN γ , etc.), anticuerpos contra interleucinas (por ejemplo, IL-12, IL-15, IL-4, IL-5, etc.), etc.

En otra realización particular, dicho resto heterólogo comprende un dominio no-IgG, como un factor de crecimiento, por ejemplo, VEGF. Ejemplos adicionales, no limitativos de dichos factores de crecimiento incluyen miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (Familia EGF), miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), angiopoyetinas, etc.

En otra realización particular, el resto heterólogo comprende una etiqueta de purificación de afinidad para obtener un TPC de la invención sustancialmente puro, particularmente si cada uno de los tres polipéptidos monómeros comprende una etiqueta de purificación, dichas etiquetas son diferentes entre sí (por

ejemplo, etiquetas de purificación de afinidad "a", "b" y "c", donde la etiqueta "a" se reconoce por la sustancia de unión A, la etiqueta "b" es reconocida por la sustancia de unión B, y la etiqueta "c" es reconocido por la sustancia de unión C), y se somete a un procedimiento de purificación por afinidad de tres pasos diseñado para permitir la recuperación selectiva de solo aquellos TPC de la invención que exhiben afinidad por la sustancias correspondientes (A, B y C en la ilustración). Dicha etiqueta de purificación de afinidad se puede fusionar directamente en línea o, alternativamente, se puede filtrar al polipéptido monómero a través de un enlazador escindible, es decir, un segmento peptídico que contiene una secuencia de aminoácidos que es específicamente escindible por medios enzimáticos o químicos (es decir, un sitio de reconocimiento / escisión). En una realización particular, dicho enlazador escindible comprende una secuencia de aminoácidos que es escindible por una proteasa tal como una enterocinasa, endoproteasa Arg-C, Endoproteasa Glu-C, endoproteasa Lys-C, factor Xa, etc.; alternativamente, en otra realización particular, dicho enlazador escindible comprende una secuencia de aminoácidos que es escindible por un reactivo químico, como, por ejemplo, bromuro de cianógeno que corta residuos de metionina, o cualquier otro reactivo químico adecuado. El enlazador escindible es útil si es deseable la eliminación posterior de las etiquetas de purificación de afinidad.

En una realización particular, cuando el resto heterólogo es un péptido, dicho resto heterólogo está unido covalentemente al XVIIIITSE mediante un péptido de enlace al extremo C-terminal de la cadena peptídica XVIIIITSE. Si, además, el TPC de la invención comprende un polipéptido monómero, dicho polipéptido monómero que comprende un XVIIIITSE y un resto heterólogo, dicho resto heterólogo es un péptido posicionado N - terminalmente a dicho polipéptido monómero, luego dicho resto heterólogo está unido covalentemente al XVIIIITSE mediante un enlace peptídico en la porción N-terminal de la cadena peptídica XVIIIITSE. En una realización particular, dicho resto heterólogo está directamente y covalentemente unido al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero.

En otra realización particular, dicho resto heterólogo no está unido covalentemente directamente al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero, pero está unido a través de un espaciador, es decir, un péptido de unión o enlace inerte de longitud y secuencia adecuados, entre el polipéptido monómero y el resto heterólogo [es decir, formando una estructura del resto polipéptido monómero-espaciador-heterólogo]. En general, dicho espaciador actúa como una región de bisagra entre dichos dominios, lo que les permite moverse independientemente uno de otro manteniendo la forma tridimensional de los dominios individuales. En este sentido, un espaciador preferido sería una región bisagra caracterizada por una ductilidad estructural o flexibilidad que permite este movimiento. La longitud del espaciador puede variar; típicamente, el número de aminoácidos en el espaciador es de 100 o menos aminoácidos, preferiblemente 50 o menos aminoácidos, más preferiblemente 40 o menos aminoácidos, aún más preferiblemente, 30 o menos aminoácidos, o incluso más preferiblemente 20 o menos aminoácidos. Del mismo modo, cuando el TPC de la invención comprende un polipéptido monómero en el que un resto heterólogo está unido covalentemente al extremo N-terminal de dicho polipéptido monómero, dicho resto heterólogo puede unirse directamente de forma covalente al extremo N-terminal de dicho polipéptido monómero o, alternativamente, dicho resto heterólogo puede unirse al extremo N-terminal de dicho polipéptido monómero a través de un espaciador formando así una estructura polipeptídica heteróloga de resto heterólogo-espaciador-monómero.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos de espaciadores incluyen un enlazador de poliglicina; secuencias de aminoácidos como las que se muestran en la SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, etc. En una realización particular, dicho espaciador es un péptido que tiene la flexibilidad estructural (es decir, un péptido de unión flexible o "enlazador flexible" y comprende 2 o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina. En otra realización particular, el espaciador es un péptido que contiene repeticiones de residuos de aminoácidos, particularmente Gly y Ser, o cualquier otra repetición adecuada de residuos aminoácidos prácticamente cualquier enlazador flexible se puede usar como espaciador de acuerdo con esta invención. Ejemplos ilustrativos de enlazadores flexibles incluyen secuencias de aminoácidos tales como los que se muestran en la SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, o SEC ID NO: 11. Sin embargo, en una realización particular dicho espaciador es un enlazador flexible que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO 12.

Alternativamente, un espaciador adecuado puede basarse en la secuencia de 10 residuos aminoácidos de la región de la bisagra superior de la IgG3 murina; dicho péptido (SEC ID NO: 13) se ha utilizado para la producción de anticuerpos dimerizados [Pack P. and Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584] y puede ser útil como péptido espaciador según la presente invención. Aún más preferiblemente, puede ser una secuencia correspondiente de la región bisagra superior de la IgG3 humana u otra IgG humana de entre las subclases (IgG1, IgG2, IgG4, IgM e IgA). Las secuencias de las IgG humanas no se espera que sea inmunogénicas en los seres humanos. Separadores adicionales que pueden ser utilizados en la presente invención incluye los péptidos de las secuencias de aminoácidos GAP, AAA o los que se muestran en la SEC ID NO: 14 y la SEC ID NO: 15.

En una realización particular, el polipéptido monómero está unido covalentemente a un solo resto heterólogo; En ese caso, dicho resto heterólogo está covalentemente unido por cualquiera de los medios

mencionados anteriormente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico, al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende el péptido XVIIIITSE; este tipo de polipéptido monómero puede designarse como "péptido monómero C-terminal" y representado como "XVIIIITSE-HM", en donde HM significa resto heterólogo. La fracción XVIIIITSE es la que se definió previamente.

5

En otra realización particular, un polipéptido monómero está unido covalentemente a dos restos heterólogos; en esta realización, según la invención, al menos uno de dichos restos heterólogos está covalentemente unido al extremo C-terminal del polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE. Así, según esta particular realización, uno de los restos heterólogos está unido al extremo C-terminal y el otro puede unirse al extremo N-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende el XVIIIITSE, o, alternativamente, ambos restos heterólogos pueden estar unidos entre sí y enlazados al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE.

10

15

Así, en una realización específica, un primer resto heterólogo está unido a la extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero y un segundo resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho polipéptido monómero (este tipo de polipéptido monómero puede ser designado como polipéptido monómero N-/C-terminal y representado como "HM2-XVIIIITSE-HM1", en donde HM1 significa un primer resto heterólogo, HM2 significa un segundo resto heterólogo y XVIIIITSE es el que se definió previamente). Dicho primero y segundo restos heterólogos pueden ser iguales o diferentes. Si el primero y el segundo de los restos heterólogos son iguales el polipéptido monómero resultante será mono-específico (por ejemplo, capaz de reaccionar con un solo determinante antigénico), mientras que si el primer y segundo resto heterólogo son diferentes entre sí, entonces el polipéptido monómero resultante será bio-específico (por ejemplo, capaz de reaccionar con cada determinante antigénico diferente permitiendo al polipéptido monómero reaccionar con dos determinantes antigénicos diferentes). Por lo tanto, esta particular realización relacionada con un polipéptido monómero que comprende dos restos heterólogos que están vinculados a través de enlaces peptídicos al extremo C y N, respectivamente, (es decir, N-/C-terminal polipéptido monómero) constituye una realización interesante de la invención. Este enfoque introduce una serie de posibilidades en términos de, por ejemplo, vincular entidades más grandes con la invención para tener actividades específicas acopladas a cada extremo de los monómeros.

20

25

30

35

En otra realización específica, un primer resto heterólogo (HM1) está unido a un segundo resto heterólogo (HM2), en cualquier orden (HM1-HM2 o HM2-HM1), y también enlazado solo al extremo C-terminal del polipéptido monómero formando así, por ejemplo, una estructura en línea o en tándem, unida al extremo C-terminal del polipéptido monómero "XVIIIITSE-HM1-HM2" o "XVIIIITSE-HM2-HM1". Dichos primer y segundo restos heterólogos pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, en dichas estructuras "en línea" o "en tándem" las partes heterólogas están unidas entre sí por medio de un espaciador; en una realización particular, dicho espaciador es un péptido de unión flexible o un enlazador como se definió anteriormente.

40

45

El experto en la materia entenderá que en realizaciones adicionales cada uno de los polipéptidos monómeros del complejo polimérico trimérico (TPC) de la invención puede estar unidos a uno o más restos heterólogos, por ejemplo, 2, 3, etc., en cualquiera de los extremos (C-terminal y N-terminal) de dicho polipéptido monómero que comprende la cadena polipeptídica XVIIIITSE, ya sea en ambos extremos o formando una estructura en tándem, siempre que al menos uno de dichos restos heterólogos, en al menos uno de los polipéptidos monómeros que forman el complejo trimérico de la invención, está covalentemente unido al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE.

50

55

60

Por lo tanto, en una realización específica, al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho polipéptido monómero para producir un polipéptido monómero; este tipo de polipéptido monómero puede representarse como "(HM1)_n-XVIIIITSE-(HM2)_m", en el que el número total de restos heterólogos (n + m) es al menos 3 y m es al menos 1, cada HM1 es, independientemente, igual o diferente a otro HM1, y cada HM2 es, independientemente, igual o diferente a otros HM2. Además, cada HM1 puede ser igual o diferente a cada HM2. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de este tipo de polipéptido monómero incluye polipéptidos monómeros en los que uno o más restos heterólogos están vinculados al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero y uno o más restos heterólogos están unidos al extremo N-terminal de dicho polipéptido monómero en el que el número de los restos heterólogos es igual o superior a tres.

65

Como se discutió anteriormente, los restos heterólogos pueden estar unidos directamente entre sí o alternativamente en una realización particular, se pueden vincular a través de un espaciador. Los detalles de dicho espaciador han sido mencionados anteriormente.

Según la presente invención, el TPC de la invención comprende tres polipéptidos monómeros, en donde (i) cada uno de dichos polipéptidos monómeros comprende un XVIIIITSE, y (ii) al menos uno de dichos

polipéptidos monómeros está unido covalentemente al menos un resto heterólogo, en el que dicho resto heterólogo está posicionado C-terminalmente a dicho polipéptido monómero; es decir, el resto heterólogo está covalentemente unido al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero.

- 5 Así, en una realización particular, el TPC de la invención comprende tres polipéptidos monómeros, en donde (i) cada uno de dichos polipéptidos monómeros comprende un XVTSE y (ii) solo uno de dichos polipéptidos monómeros está covalentemente unido a al menos un resto heterólogo, estando colocado dicho resto heterólogo C-terminalmente a dicho monómero polipéptido. De acuerdo con esta realización particular, sólo uno de los polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la invención están
10 enlazados covalentemente al menos a un resto heterólogo, a saber, al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE. En una realización particular, dicho polipéptido monómero está unido covalentemente a un resto heterólogo. En otra realización particular, dicho polipéptido monómero está unido covalentemente a dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4 o incluso más, restos heterólogos; dichos restos heterólogos pueden ser iguales o diferentes entre sí. Si el polipéptido monómero está covalentemente unido a dos o más restos heterólogos, dichos restos heterólogos pueden unirse al extremo C-terminal del polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE, o
15 alternativamente, al menos un resto heterólogo puede estar unido al extremo C-terminal del polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo se puede unir al extremo N-terminal del polipéptido monómero.
- 20 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de esta realización del TPC de la invención en la que solo un polipéptido monómero está unido al menos a un resto heterólogo, estando colocado dicho resto heterólogo C-terminalmente a dicho monómero polipéptido, incluyen los TPC de la invención en los que:
- al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal del polipéptido monómero; o
alternativamente,
25 - al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal del polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal del polipéptido monómero.

- En otra realización particular, el TPC de la invención comprende tres polipéptidos monómeros, en donde (i) cada uno de dichos polipéptidos monómeros comprende un XVTSE y (ii) cada uno de dos de dichos polipéptidos monómeros está unido covalentemente a al menos un resto heterólogo, en el que al menos un resto heterólogo está posicionado C-terminal al menos a un polipéptido monómero. Según esta particular realización, cada uno de dos de los tres polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la invención, está independientemente covalentemente unido al menos a un resto heterólogo con la condición de que en al menos uno de dichos polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la
30 invención está covalentemente unido al menos a un resto heterólogo al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE. Por lo tanto, de acuerdo con esta realización particular, el TPC de la invención comprende un primer polipéptido monómero unido covalentemente al menos a un resto heterólogo y un segundo polipéptido monómero unido covalentemente al menos a un resto heterólogo, sometido a la condición mencionada anteriormente (es decir, en al menos uno de dichos polipéptidos monómeros, al menos un resto heterólogo está unido covalentemente al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende la cadena polipeptídica XVIIIITSE), en donde los restos heterólogos unidos a cada uno de dichos primero y segundo polipéptido monómero puede ser igual o diferente. Además, como se discutió anteriormente, al menos uno de dichos restos heterólogos tiene que estar unido al extremo C-terminal del polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE, o alternativamente, si alguno de los polipéptidos monómeros está unido covalentemente a dos o más restos heterólogos, los restos heterólogos se pueden vincular al extremo N-terminal o al extremo C-terminal, de uno de los polipéptidos monómeros que comprenden la cadena peptídica XVIIIITSE siempre que en el otro polipéptido monómero al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal del polipéptido monómero. El experto en la materia reconocerá que cualquier combinación de restos heterólogos puede estar presente en esta realización particular; es decir, en una realización específica, por ejemplo, un primer polipéptido monómero se puede enlazar a uno o más restos heterólogos y un segundo polipéptido monómero puede unirse a uno o más restos heterólogos siempre que al menos un resto heterólogo sea posicionado C-terminalmente al menos a un polipéptido monómero.
35

- 55 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de esta realización del TPC de la invención en el que cada uno de ambos polipéptidos monómeros está unido al menos a un resto heterólogo, en el que al menos un resto heterólogo está posicionado C-terminalmente a dicho polipéptido monómero, se incluyen los TPC de la invención en los que:
60 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de un segundo polipéptido monómero; o alternativamente,
-al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de un segundo polipéptido monómero; o
alternativamente,
65 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho primer polipéptido monómero,

y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de un segundo monómero polipéptido; o alternativamente,

- 5 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho primer polipéptido monómero, y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de un segundo monómero polipéptido; o alternativamente,
- 10 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho primer polipéptido monómero, y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de un segundo monómero polipéptido y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de dicho segundo polipéptido monómero.

En otra realización particular, el TPC de la invención comprende tres polipéptidos monómeros, en donde (i) cada uno de dichos polipéptidos monómeros comprende un XVTSE y (ii) cada uno de los tres polipéptidos monómeros está unido covalentemente al menos a un resto heterólogo, en el que al menos un resto heterólogo está posicionado en el extremo C-terminal al menos a un polipéptido monómero. Según esta particular realización, cada uno de los tres polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la invención, independientemente, está unido covalentemente a al menos un resto heterólogo con la condición de que en al menos uno de dichos polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la invención al menos un resto heterólogo está unido covalentemente al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende el péptido XVIIIITSE. Por lo tanto, de acuerdo con esta realización particular, el TPC de la invención comprende un primer polipéptido monómero unido covalentemente al menos a un resto heterólogo, un segundo polipéptido monómero unido covalentemente al menos a un resto heterólogo, y un tercer polipéptido monómero unido covalentemente al menos a un resto heterólogo, sometido a la condición mencionada anteriormente (es decir, en al menos uno de dicho monómero polipéptidos, al menos un resto heterólogo está unido covalentemente al extremo C-terminal de dicho polipéptido monómero que comprende la cadena peptídica XVIIIITSE), en donde los restos heterólogos unidos a cada uno de dichos primer, segundo y tercer monómero el polipéptido puede ser igual o diferente entre sí, e. g., todas las tres mitades heterólogas pueden ser iguales, o dos de los tres grupos heterólogos pueden ser iguales entre sí y diferente al otro, o, alternativamente, los tres grupos heterólogos pueden ser diferentes entre sí. El experto en la materia reconocerá que cualquier combinación de restos heterólogos pueden estar presentes en esta realización particular; es decir, por ejemplo, un primer polipéptido monómero puede estar unido a uno o más restos heterólogos, el segundo polipéptido monómero puede estar unido a uno o más de los restos heterólogos y el tercer polipéptido monómero se pueden unir a uno o más restos heterólogos siempre que al menos un resto heterólogo esté posicionado C-terminalmente al menos a un polipéptido monómero.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de esta realización del TPC de la invención en la que cada uno de los polipéptidos monómeros está unido a al menos un resto heterólogo, en el que al menos un resto heterólogo está posicionado C-terminalmente a dicho polipéptido monómero, se incluyen los TPC de la invención en los que:

- 40 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de un tercer polipéptido monómero; o, alternativamente,
- 45 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de un tercer polipéptido monómero; o, alternativamente,
- 50 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de un tercer polipéptido monómero; o, alternativamente,
- 55 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo N-terminal (o, alternativamente, en el extremo C-terminal) de un tercer polipéptido monómero; o alternativamente,
- 60 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal (o, alternativamente, en el extremo N-terminal) de un segundo monómero polipéptido y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal (o, alternativamente, en el extremo N-terminal) de un tercer polipéptido monómero; o alternativamente,
- 65 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo N-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo N-terminal de un tercer polipéptido monómero; o alternativamente,

- al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está enlazado al extremo C-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un tercer polipéptido monómero; o alternativamente,
- 5 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de dicho primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo N-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un tercer polipéptido monómero; o alternativamente,
- 10 -al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho primer polipéptido monómero, al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo N-terminal de un segundo polipéptido monómero y
- 15 al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de dicho segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido a extremo N-terminal (o, alternativamente, en el extremo C-terminal) de un tercer monómero polipéptido; o alternativamente,
- al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo C-terminal de un primer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de dicho primer polipéptido monómero,
- 20 al menos un resto heterólogo está vinculado al extremo N-terminal de un segundo polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de dicho segundo polipéptido monómero, y al menos un resto heterólogo está unido al extremo N-terminal de un tercer polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo está unido al extremo C-terminal de dicho tercer polipéptido monómero.
- 25 Por lo tanto, como se describió anteriormente, el TPC de la invención puede ser un homotrímero (es decir, todos los polipéptidos monómeros son iguales entre sí) o un heterotrímero (es decir, al menos uno de los polipéptidos monómeros son diferentes de los otros dos polipéptidos monómeros).
- Además, la especificidad del TPC de la invención se puede diseñar para la obtención de complejos mono o multiespecíficos. Así, en una realización particular, cuando un resto heterólogo es un anticuerpo o un fragmento del mismo, el TPC de la invención puede ser monoespecífico (por ejemplo, cuando el resto heterólogo (por ejemplo, anticuerpo o fragmento del mismo) en cada uno de los tres polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la invención es la misma, es decir, es específico para un solo antígeno), biespecífica (por ejemplo, cuando uno de los restos heterólogos (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo reconoce un primer antígeno) en uno de los polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la invención es diferente de otro resto heterólogo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) que reconoce un segundo antígeno, en el que dicho segundo antígeno es diferente de dicho primer antígeno) en el mismo o diferente polipéptido monómero), o incluso, la especificidad del TPC de la invención puede ser mayor, es decir, el TPC de la invención puede ser trispecífico (por ejemplo, cuando uno de los restos heterólogos (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo reconoce un primer antígeno) en uno de los polipéptidos monómeros que constituyen el TPC de la invención es diferente de otro resto heterólogo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce un segundo antígeno (diferente) en el mismo o diferente polipéptido monómero y diferente de otro resto heterólogo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce un tercer antígeno diferente) en el mismo o polipéptido de monómero diferente, o incluso más elevado (tetra, penta o hexa específico).
- Además, la valencia del TPC de la invención se puede diseñar para obtener complejos monovalentes o multivalentes. Así, en una realización particular, cuando un resto heterólogo es un anticuerpo o un fragmento del mismo, el TPC de la invención puede ser monovalente (es decir, el número de sitios de unión a antígeno que posee el anticuerpo o el fragmento del mismo es uno), bivalente (es decir, el número de anticuerpos o fragmentos de los mismos) que están presentes en el TPC de la invención son dos), trivalentes (es decir, el número de los anticuerpos o fragmentos de los mismos que están presentes en el TPC de la invención son tres), tetravalente (es decir, el número de anticuerpos o fragmentos de los mismos que están presentes en el TPC de la invención es cuatro), pentavalente (es decir, el número de anticuerpos o fragmentos) que están presentes en el TPC de la invención son cinco), o incluso hexavalentes (es decir, el número de anticuerpos o fragmentos de los mismos que están presentes en el TPC de la invención es seis). Formatos multivalentes de anticuerpos recombinantes (por ejemplo, scFv, Fabs, dominios únicos, etc.) aumenta la afinidad, disminuye las tasas de disociación cuando está unido a antígenos de la superficie celular, y mejora la biodistribución, entre otros.
- 50 Por lo tanto, el TPC de la invención constituye una plataforma enormemente flexible para diferentes aplicaciones, incluida la ingeniería de proteínas.
- 65 Efectivamente, una realización particularmente interesante de la invención es la posibilidad de diseñar ensamblajes moleculares orientados, donde uno o más dispositivos fijos las entidades se ubican en el extremo C-terminal al XVIIIITSE y una o más entidades auxiliares están ubicadas en el extremo N-terminal

de dicho elemento de trimerización (XVIIIITSE). Tales tipos de diseño pueden ser particularmente ventajosos cuando se desea una cierta relación relativa entre las diferentes entidades incluidas en una unidad molecular específica. Este tipo de diseño además, se puede utilizar si una o más entidades auxiliares para fines estructurales o por razones de seguridad aparecen incompatibles dentro del mismo constructo. Tal puede ser el caso, por ejemplo, si una o más de las entidades se representan grandes o voluminosos dominios proteicos que por razones estéricas podrían prevenir la formación de las moléculas triméricas como unidad molecular debido a restricciones estéricas.

Además, la posibilidad de construir proteínas de fusión biespecíficas en la que en cada una ellas se encuentra en el extremo C-terminal del XVIIIITSE y una funcionalidad diferente se coloca en el extremo N-terminal de dicho XVIIIITSE es además ventajoso en aplicaciones donde una separación espacial grande entre las dos especificidades es deseable para una óptima fijación. Ejemplos de dicha aplicación son, por ejemplo, el despliegue de dominios de unión (por ejemplo, módulos de unión derivados de anticuerpos para reconocimiento y unión a sitios de unión ubicados en o cerca de estructuras grandes como membranas celulares en los casos en que es ventajoso para permitir la unión del otro extremo de la molécula trimerizada a una diana u objetivo diferente, pero también voluminoso.

Por lo tanto, como se discutió anteriormente, el TPC de la invención se puede usar para unir, por ejemplo, superficies o dominios voluminosos por dicho complejo que comprende al menos un resto heterólogo que es posicionado en el extremo C-terminal del XVIIIITSE y al menos un grupo heterólogo que se coloca en el extremo N-terminal de dicho XVIIIITSE. Los dos restos heterólogos pueden ser parte del mismo polipéptido monómero o parte de dos monómeros polipéptidos separados.

El XVIIIITSE, esencialmente e indiscriminadamente, formará homo- y hetero-trímeros con cualquier molécula que también contenga dicho módulo de trimerización. Para algunas aplicaciones, puede ser ventajoso tener disponibles derivados especialmente diseñados del XVIIIITSE, que se han rediseñado para impedir la formación de homo-trímeros y, por lo tanto, solo se permite la hetero-trimerización. Así, una importante realización del monómero que constituye el TPC de la invención está construido / rediseñado de modo que desfavorezca la formación de complejos entre XVIIIITSE idénticos; esto también tiene la implicación de que dichos polipéptidos monómeros pueden diseñarse ventajosamente para que desfavorezca la formación de trímeros incluyendo dos polipéptidos monómeros que tienen idénticos XVTSEs. Una forma de desfavorecer la formación de homo-trimerización sería mediante mutagénesis.

El diseño / reingeniería se puede lograr mediante la introducción de sustitución de aminoácidos en los sitios en el polipéptido monómero íntimamente involucrado en la formación y la estabilidad del trímero y, simultáneamente, en un constructo diferente se introduce una sustitución compensatoria de aminoácidos, eliminando la simetría entre los componentes monómeros de la estructura helicoidal triple para que el perfil de complementariedad solo permite la formación de hetero-trímeros, pero es incompatible con alguna o con cada una de las especies de homotrímeros.

El TPC de la invención se puede preparar por métodos generalmente conocidos en el arte, basado, por ejemplo, en técnicas de producción de proteínas recombinantes. Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para preparar el TPC de la invención, el método que comprende aislar el TPC de la invención de un cultivo que comprende una célula huésped que expresa un fragmento de ácido nucleico que codifica al menos uno de los polipéptidos monómeros del TPC de la invención y, opcionalmente, someter el TPC de la invención para el tratamiento ulterior.

El fragmento de ácido nucleico que se menciona anteriormente, en lo sucesivo denominado el ácido nucleico de la invención es también parte de la invención y se define como un fragmento de ácido nucleico en forma aislada que codifica la parte polipeptídica de un polipéptido monómero de acuerdo con la invención, dicha parte polipeptídica de dicho polipéptido monómero que comprende el XVIIIITSE y un resto heterólogo cuando el resto heterólogo es un péptido, posicionándose dicho resto heterólogo C-terminalmente a dicho polipéptido monómero, en el que dicho polipéptido monómero se define en la invención. En una realización particular, la secuencia del ácido nucleico codifica el XVIIIITSE comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID NO: 2, que corresponde a la región N-terminal del dominio NCI del colágeno XVIII humano.

Como se mencionó anteriormente, el ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la parte polipeptídica de un polipéptido monómero que está presente en el TPC de la invención. La parte polipeptídica de dicho polipéptido monómero comprende el XVIIIITSE y el resto heterólogo cuando el resto heterólogo es un péptido, estando colocado dicho resto heterólogo C-terminalmente a dicho polipéptido monómero, en el que dicho polipéptido monómero se define como en la invención. Como ha sido mencionado anteriormente, el polipéptido monómero se puede fusionar a uno o más estos heterólogos en los que al menos uno de dichos restos heterólogos está fijado en el extremo C-terminal del polipéptido monómero; así, cuando dichos restos heterólogos son péptidos, el ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el XVIIIITSE y la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican dicho resto o restos heterólogos. En ese caso, el extremo 5'

de la secuencia de nucleótidos que codifica dicho resto heterólogo está fijado en el extremo 3'cde la secuencia de nucleótidos que codifica el XVIIIITSE. Dichas secuencias de nucleótidos pueden unirse operativamente de modo que cada secuencia sea correctamente expresada por un solo promotor o, alternativamente, cada secuencia de nucleótidos esta bajo el control de promotores independientes.

5 Dichos promotores pueden ser inducibles o constitutivos. El ácido nucleico de la invención puede incluir, si se desea, operativamente vinculado a la secuencia de nucleótidos que codifica el espaciador entre el polipéptido monómero y el resto heterólogo y / o la secuencia de nucleótidos que codifica el enlazador escindible entre el polipéptido monómero y el resto heterólogo.

10 El ácido nucleico de la invención puede prepararse mediante genética tradicional y/o técnicas de ingeniería genética.

La célula huésped mencionada anteriormente, en lo sucesivo denominada célula huésped de la invención, que también es parte de la invención, puede ser preparada por técnicas de ingeniería que comprenden insertar el ácido nucleico de la invención en un vector de expresión adecuado, transformando una célula huésped adecuada con el vector, y cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de la parte polipeptídica del monómero que constituye el TPC de la invención. Dicho vector que comprende el ácido nucleico de la invención, en lo sucesivo denominado el vector de la invención, es también una parte de la invención. El ácido nucleico de la invención puede ser colocado

15 bajo el control de un promotor adecuado que puede ser inducible o constitutivo. Dependiendo del sistema de expresión, el polipéptido se puede recuperar de la fase extracelular, el periplasma o del citoplasma de la célula huésped.

Los sistemas de vectores adecuados y las células hospedadoras son bien conocidos en la técnica como se demuestra por la gran cantidad de literatura y materiales disponibles para la persona experta. La presente invención también se refiere al uso del ácido nucleico de la invención, la construcción de vectores y las células huésped, a continuación se proporciona una discusión general relacionada con dicho uso y las consideraciones particulares en la práctica de este aspecto de la invención.

30 En general, por supuesto, se prefieren los procariotas para la clonación inicial de ácido nucleico de la invención y construcción del vector de la invención. Por ejemplo, además de las cepas particulares mencionadas en la descripción más específica a continuación, a modo de ejemplo se pueden mencionar, cepas como la cepa de E. coli K12 (ATCC No. 31446), E. coli B y E. coli X 1776 (ATCC No. 31537). Estos ejemplos, pretenden ser ilustrativos y no limitativos.

Los procariotas también pueden utilizarse para la expresión, y una purificación eficiente ya que estrategias de replegamiento de proteínas están disponibles. Las cepas mencionadas, así como E. coli. W3110 (F, lambda, prototrófica, ATCC No. 273325), bacilos como el de Bacillus subtilis, u otras enterobacterias tales como Salmonella typhimurium o Serratia marcescens, y varias especies de Pseudomonas.

40

En general, los vectores plasmídicos que contienen replicón y secuencias de control que son derivados de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en relación con estos hospedadores. El vector normalmente lleva un sitio de replicación, así como secuencias de marcado que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, E. coli se transforma típicamente usando un plásmido pBR322 derivado de una especie E. coli. El plásmido pBR322 contiene genes para la resistencia a la ampicilina y tetraciclina y por lo tanto proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. El plásmido pBR322, u otro plásmido microbiano o fago también debe contener, o modificarse para que contenga promotores que pueden ser utilizados por el microorganismo para la expresión.

45

50

Aquellos promotores más utilizados en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas de B-lactamasa (penicilinas) y promotor de lactosa y/o triptófano (trp) (EP 36776). Si bien estos son los más utilizados, se han descubierto y utilizado otros promotores microbianos, y detalles sobre sus secuencias de nucleótidos se han publicado y permiten a un experto en la materia unirlas funcionalmente con vectores plasmídicos. Ciertos genes de procariotas pueden ser expresados eficientemente en E. Coli a partir de sus propias secuencias promotoras, lo que excluye la necesidad de adición de otro promotor por medios artificiales.

55

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, como los cultivos de levadura, también pueden ser usados. Saccharomyces cerevisiae, o levadura de panadero común, es la más común se utiliza entre los microorganismos eucariotas, aunque otras cepas están comúnmente disponibles para la expresión en Saccharomyces, el plásmido YRp7, por ejemplo, se utiliza comúnmente. Este plásmido ya contiene el gen trp1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-I (Jones, 1977, Genetics, 85: 23-33). La presencia de la lesión trp1 como característica del genoma de la célula huésped de la levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

60

65

Las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para 3-Fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, como enolasa, gliceraldehído, 3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglicosa isomerasa y glucocinasa. En la construcción de plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas con estos genes son también ligadas en el vector de expresión en posición 3' de la secuencia que se desea expresar para proporcionar poliadenilación del ARNm y terminación.

Otros promotores, que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento son la región promotora de alcohol deshidrogenasa-2, Isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con metabolismo del nitrógeno, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Cualquier vector plasmídico contiene un promotor compatible con levaduras, origen de replicación y secuencias de terminación adecuados.

Además de los microorganismos, cultivos de células derivadas de células multicelulares también se pueden utilizar como hospedadores. En principio, cualquier cultivo celular de este tipo es viable, ya sea de vertebrados o de cultivos invertebrados. Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina en los últimos años. Ejemplos de tales líneas de células huésped útiles son VERO y Células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y W138, BHK, COS-7, células de riñón humano embrionario (HEK) 293 y líneas celulares MDCK.

Los vectores de expresión para tales células generalmente incluyen (si es necesario) un origen de replicación, un promotor ubicado frente al gen a expresar, junto con cualquier sitio de unión a ribosomas necesarios, sitios de empalme de ARN, sitio de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales.

Para uso en células de mamíferos, las funciones de control en los vectores de expresión están a menudo proporcionadas por material viral; por ejemplo, se derivan promotores de uso común de poliovirus, adenovirus, citomegalovirus (CMV) y con mayor frecuencia Simian Virus 40 (SV40). Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 son particularmente útiles porque ambos se obtienen fácilmente del virus como un fragmento que también contiene el origen viral SV40 de la replicación. También se pueden usar fragmentos SV40 más pequeños o más grandes, siempre que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio HindIII hacia el sitio BglI ubicado en el origen viral de replicación. Además, es también posible, y a menudo deseable, utilizar secuencias promotoras o de control normalmente asociadas con la secuencia génica deseada, siempre que dichas secuencias de control sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

Se puede proporcionar un origen de replicación mediante la construcción del vector a incluir un origen exógeno, como el que puede derivarse de SV40 u otro virus (por ejemplo, poliovirus, adeno, etc.) o puede ser proporcionado por la replicación cromosómica de la célula huésped. Si el vector está integrado en el cromosoma de la célula huésped, este último es a menudo suficiente.

Sobre la producción del polipéptido monómero que constituye el TPC de la invención, puede ser necesario procesar los polipéptidos adicionalmente, p. ej. Introduciendo funciones no proteicas en el polipéptido, al someter el material a condiciones adecuadas de plegamiento (por ejemplo, utilizando las estrategias de aplicación general sugeridas en W094/18227), o por escisión de restos peptídicos no deseados del monómero (por ejemplo, fragmentos peptídicos potenciadores de la expresión que no son deseados en el producto final).

A la luz de la discusión anterior, los métodos para producir de forma recombinante dicho TPC de la invención o dicho polipéptido monómero que constituye el TPC de la invención también forma parte de la invención, al igual que los vectores que llevan y / o son capaces de replicar el ácido nucleico de la invención en una célula huésped o en una línea celular. De acuerdo con la invención, el vector de expresión puede ser, por ejemplo, un virus, un plásmido, un cósmido, un minicromosoma o un fago. Especialmente interesantes son los vectores que son integrados en el genoma de la línea celular / célula hospedadora después de la introducción en el hospedador.

Otro aspecto de la invención son las células transformadas (es decir, la célula huésped de la invención), útiles en los métodos descritos anteriormente, portadores y capaces de replicar el ácido nucleico de la invención; La célula huésped puede ser un microorganismo como una bacteria, una levadura, o un protozoo, o una célula derivada de un organismo multicelular como un hongo, una célula de insecto, una célula de planta o una célula de mamífero. Especialmente interesantes son las células de las especies bacterianas Escherichia, Bacillus y Salmonella, y un preferiblemente la bacteria E. Coli.

Otro aspecto más de la invención se refiere a una línea celular estable que produce el polipéptido monómero que constituye el TPC de la invención o el polipéptido parte de la misma, y preferiblemente la línea que celular transporta y expresa el ácido nucleico de la invención. Especialmente interesantes son las células derivadas de las líneas celulares de mamíferos HEK-293y CH0.

5

Como es evidente para el experto en la materia, el TPC de la invención puede ser un homotrímero (es decir, todos los tres polipéptidos monómeros son idénticos) o un heterotrímero (es decir, al menos uno de los tres polipéptidos monómeros es diferente de los otros).

10

Cuando el TPC de la invención es un homotrímero, el método para producir dicho homotrímero recombinantemente comprende insertar el ácido nucleico de la invención en un vector de expresión adecuado, transformando una célula huésped adecuada con el vector, y el cultivo de la célula huésped en condiciones que permitan la expresión del monómero polipéptido según la invención y su trimerización. En este caso, el ácido nucleico de la invención debe prepararse, dicho ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el XVIIIITSE y el nucleótido secuencia que codifica la parte polipeptídica del resto heterólogo. Las consideraciones a aplicar a otros procesadores mencionados anteriormente también se aplica a este método.

15

20

Cuando el TPC de la invención es un heterotrímero, dicho heterotrímero puede comprender (i) solo un polipéptido monómero diferente de los otros dos polipéptidos monómeros, siendo estos dos polipéptidos monómeros idénticos entre sí, o, alternativamente, (ii) tres polipéptidos monómeros diferentes.

25

En el primer caso, cuando el TPC de la invención es un heterotrímero en el que solo un polipéptido monómero (MP1) es diferente de los otros dos polipéptidos monómeros (MP2), el método para producir de forma recombinante dicho heterotrímero comprende insertar un primer ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el XVIIIITSE y la secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido monómero (MP1) en un vector de expresión adecuado, y un segundo ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el XVIIIITSE y la secuencia de nucleótidos que codifica el otro polipéptido monómero (MP2) en un vector de expresión adecuado, transformando (co-transfectando) una célula huésped adecuada con dichos vectores, y cultivando la célula huésped bajo condiciones que permiten la expresión de los polipéptidos monómeros de acuerdo con la invención y su trimerización para rendir el heterotrímero. En este caso, dos ácidos nucleicos de la invención debe ser preparados, uno de las cuales comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido monómero (por ejemplo, MP1) y el otro que codifica el otro polipéptido monómero (MP2). Las consideraciones que se aplican a su posterior procesamiento mencionado anteriormente se aplican a este método también.

30

35

40

En el segundo caso, cuando el TPC de la invención es un heterotrímero en el que todos los tres polipéptidos monómeros son diferentes entre sí (por ejemplo, MP1, MP2 y MP3), el método para producir de forma recombinante dicho heterotrímero comprende insertar un primer ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el XVIIIITSE y el nucleótido de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido monómero 1 (MP1) en un vector de expresión adecuado, insertando un segundo ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el XVIIIITSE y el nucleótido de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido monómero 2 (MP2) en un vector de expresión adecuado, y la inserción de un tercer ácido nucleico de la invención que comprende el nucleótido de la secuencia de codificación del XVIIIITSE y el nucleótido de la secuencia de nucleótidos que codifica para el monómero polipéptido 3 (MP3) en un vector de expresión adecuado, transformando (co-transfectando) una célula huésped adecuada con dichos vectores, y cultivando la célula huésped bajo condiciones que permiten la expresión de los polipéptidos monómeros de acuerdo con la invención y su trimerización para rendir el heterotrímero. En este caso, tres ácidos nucleicos de la invención deben ser preparados, uno de las cuales comprende la secuencia de nucleótidos codificando un polipéptido monómero (por ejemplo, MP1), otro codificando otro polipéptido monómeros (MP2), y otro que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica otro polipéptido monómero (MP3). Las consideraciones que se aplican a su posterior procesamiento. mencionado anteriormente se aplican a este método también.

45

50

55

60

Un aspecto muy importante de la invención es la posibilidad de generar un sistema diseñado especialmente para circunstancias individuales. La idea básica es la selección artificial de restos heterólogos y componentes funcionalmente activos, y elementos fijos que dan como resultado un sistema único, como se describirá con más detalle a continuación.

65

El uso del XVIIIITSE como vehículo para ensamblar fragmentos scFv o Fab monovalentes de anticuerpos en entidades oligoméricas y multivalentes también ofrecen ventajas de diseño en términos de generar anticuerpos artificiales quiméricos que tengan farmacocinética y propiedades farmacodinámicas deseables. Derivados pequeños como fragmentos scFv monómeros o los anticuerpos bivalentes (por ejemplo, diacuerpos, BITE y minicuerpos) se eliminan rápidamente del sistema circulatorio, mientras que las IgG nativas tienen una vida media más larga. A la inversa, pequeña los derivados como scFv y

minicuerpos exhiben mejores propiedades de extravasación. Se espera por lo tanto, que los anticuerpos de una especificidad deseada puedan optimizarse para necesidades diagnósticas o terapéuticas particulares mediante la ingeniería farmacológica utilizando el XVIIIITSE como un vehículo para la oligomerización controlada de, por ejemplo fragmentos scFv.

5

Un ejemplo de tal ingeniería serían los requisitos para administrar una dosis alta de un anticuerpo conjugado con imágenes o toxina para un tumor, mientras se asegura una exposición sistémica o fondo de imagen tan baja como sea posible. En tal caso un XVIIIITSE fusionado al fragmento scFv conjugado podría diseñarse para mostrar una fuerte unión multivalente al tumor y la rápida eliminación del exceso de proteína de fusión o de la circulación de conjugados.

10

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de TPCs de la invención como vehículos para ensamblar fragmentos de anticuerpos generando así anticuerpos artificiales quiméricos que tienen farmacocinética y / o propiedades farmacodinámicas preseleccionadas.

15

El uso de sistemas de administración específicos también juegan un papel importante en la conexión con la presente invención en el sentido de que tales sistemas pueden ser utilizados con respecto a diferentes usos de la presente invención para un uso terapéutico más general y con respecto a la terapia génica. Ejemplos de administración de fármacos adecuada y los sistemas de dianización se describen en Nature 392 supp. (30 de abril de 1998).

20

Además, una revisión del potencial en sistemas de imagen y terapéuticos de una gama de derivados de anticuerpos se han publicado [Holliger & Hudson, Nature Biotechnology, 2005, vol. 23, 1126-1136; y Wu & Senter, Nature Biotechnology, 2005, vol. 23, 1137-1 146]. En sus conclusiones, es evidente que la oligomerización de derivados de anticuerpos como scFv puede extender la tecnología en el campo de la ingeniería de anticuerpos en muchos aspectos importantes, algunos de los cuales se elaborarán a continuación.

25

Uno de los problemas bien conocidos inherentes a los anticuerpos monoclonales de ratón es que se tienen que "humanizar" mediante el injerto del sitio de reconocimiento del antígeno en un marco de IgG humana cuya antigenicidad del producto quimérico en pacientes humanos es a menudo difícil de suprimir por completo, lo que a veces provoca reacciones inmunitarias frente al anticuerpo de diagnóstico o terapéutico humanizado que pueden poner en peligro la vida. Tales riesgos se espera se reduzcan mucho si el anticuerpo diseñado se ensambla a partir de proteínas o fragmentos de proteínas puramente humanas. Dado que, en una realización particular, la unidad de trimerización XVIIIITSE descrita aquí es idéntica a la secuencia del colágeno XVIII humano que ya está presente en el plasma y tejido humano, hay una buena razón esperar que el XVIIIITSE no provoque una respuesta antigénica en un sujeto si se introduce como un componente de un producto quimérico que, de otro modo, no es antigénico en los humanos

30

35

40

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un TPC de la invención o un polipéptido monómero de acuerdo con la presente invención como un componente de un producto quimérico que tiene baja antigenicidad en humanos en relación con formulaciones que comprenden uno o más componentes de origen no humano.

45

En relación con la tecnología de radiomarcaje de derivados de anticuerpos, una vez más, la oligomerización con XVIIIITSE ofrece soluciones más elegantes a los problemas asociados con el etiquetado, ya que el XVIIIITSE ofrece la posibilidad de construir una o dos de las unidades monoméricas XVIIIITSE en un complejo heterotrimérico para albergar el sitio donde se ubica la etiqueta. Por lo tanto, en este formato, el etiquetado también puede limitarse a la parte del complejo, que deja el módulo de unión al antígeno completamente sin modificaciones, y el complejo puede además formularse como sea necesario.

50

En los enfoques de captura molecular, es importante aumentar el tamaño del anticuerpo por encima del umbral renal para retardar las tasas de aclaramiento. Anticuerpos trivalentes (un particular realización del TPC de la invención), o versiones truncadas solubles trivalentes de los receptores de membrana (triple trampa) tendrían un aumento de la estequiometría de unión a citoquinas solubles y factores de crecimiento. Junto con la disminución de las tasas de eliminación, la mayor avidéz de los anticuerpos trivalentes podría traducirse en una mayor capacidad que los monovalentes o bivalentes para unir y secuestrar moléculas solubles. Esto también puede ser aplicado a otras partículas patógenas contra las que se han administrado anticuerpos generados como antídotos. Estas incluyen toxinas, como la neurotoxina A botulínica o la toxina del ántrax, y virus, como los virus de la hepatitis o el virus de la varicela-zoster, en los que la multimerización se ha demostrado que es necesario para una neutralización efectiva.

55

60

65

En muchas vías de transducción de señales mediadas por receptores, las señales son activadas por el agrupamiento de moléculas receptoras en la membrana celular. Los XVIIIITSE por lo tanto tienen

importantes aplicaciones en el estudio y explotación de señalización de receptores, especialmente para los receptores que se trimerizan en la unión de ligandos como los de la familia de receptores de TNF (p. ej., CD137, OX40) como ligandos pueden presentarse como trímeros mediante fusión genética o conjugación a una unidad XVIIIITSE. Esto también tiene una aplicación importante en tecnologías de visualización de fagos para descubrir nuevos ligandos y nuevos receptores como la ingeniería de una unidad XVIIIITSE fusionada en línea a una molécula de ligando candidata permitirá la expresión junto a una proteína de revestimiento del fago, en la que solo un monómero estará vinculado a la proteína de la capa del fago. Esto puede lograrse mediante la inserción de codones ámbar en el sitio de la proteína de la capa de fago al XVIIIITSE ligado al segmento de ligando a modo de proteína de fusión codificada por el fago recombinante. En células apropiadas de *E. coli* la presencia de este codón ámbar resultará en la terminación de la traducción en la mayoría de las lecturas completas y, por lo tanto, en la mayoría de las proteínas el producto secretado al compartimento periplásmico en la bacteria infectada con fagos que incluyen el XVIIIITSE-ligando de la proteína será soluble, mientras que una minoría de la proteína de fusión también contendrá un módulo de proteína del fago, así la mayoría de los trímeros que se generarán contendrán como máximo una unidad monomérica que garantizará la integración y la exhibición en la partícula del fago recombinante maduro.

Otra ventaja de la tecnología de visualización descrita anteriormente se relaciona con el hecho que es especialmente útil para la selección sobre la base de una afinidad relativamente baja debido a la contribución de beneficio entrópico obtenido por la proximidad de los tres restos de unión en disposición espacial definida. En consecuencia, en un importante aspecto la presente invención, también se relaciona con la tecnología de librería de proteínas en la que el XVIIIITSE descrito anteriormente se utiliza.

La trimerización de ligandos recombinantes candidatos es especialmente importante ya que para muchos receptores, la señal intracelular es inducida por la agrupación de receptores, que sólo se produce si el ligando externo presenta una unión multivalente al receptor, por lo que unir dos o más moléculas receptoras.

Como se mencionó anteriormente, es un aspecto importante de la invención donde el TPC de la invención o un polipéptido monómero de acuerdo con la invención se puede usar como un componente de un producto quimérico que tiene baja antigenicidad en humanos. Como el monómero polipéptido puede ser de origen humano, se cree que la antigenicidad en humanos es baja en relación con las formulaciones que comprenden uno o más componentes de origen no humano.

Un uso principal de un TPC de la invención o un polipéptido monómero de acuerdo a la invención también serviría para generar imágenes in vitro o para administrarlo conjugado con toxinas o un anticuerpo genéticamente fusionado, o uso como vehículo que suministra una sustancia a una célula o tejido objetivo, como un tumor, como vehículo para ensamblar fragmentos de anticuerpos en oligómeros o para generar anticuerpos quiméricos como entidades multivalentes que tienen propiedades farmacocinéticas y / o farmacodinámicas preseleccionadas.

La sustancia en cuestión es una o más seleccionada del grupo de restos heterólogos así como un producto farmacéutico. También un constructo etiquetado en el que la etiqueta está acoplada a una o más de las unidades monoméricas del XVIIIITSE también está dentro del alcance de la invención.

Como se explicó en detalle anteriormente, un uso importante y sorprendente del TPC de la invención o un polipéptido monómero de acuerdo con la presente invención es para tecnología de librería de proteínas, como la tecnología de visualización de fagos.

Un uso adicional de acuerdo con la invención incluye la preparación y uso de una composición farmacéutica que comprende el TPC de la invención o un polipéptido monómero de acuerdo con la invención y opcionalmente un producto farmacéuticamente aceptable como excipiente para que la composición pueda ser administrada por una ruta seleccionada del grupo que consiste en la vía intravenosa, la vía intraarterial, la vía intravítrea, vía transmembrana del tejido bucal, anal, vaginal o conjuntival e intranasal. La ruta pulmonar, la ruta transdérmica, la ruta intramuscular, la ruta vía subcutánea, la vía intratecal, la vía oral, la inoculación en el tejido, como un tumor, o mediante un implante.

Es obvio que a partir de la divulgación de la presente invención que el tratamiento o la prevención de una enfermedad puede ser un aspecto adicional que comprende administrar al sujeto en la necesidad de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica mencionada anteriormente.

En otro uso de acuerdo con la invención, el TPC de la invención comprende al menos un resto heterólogo, en el que dicho resto heterólogo es un compuesto anti-angiogénesis para uso en la prevención y / o tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis.

En el contexto de la presente invención, se entiende que angiogénesis significa el proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. La angiogénesis también se conoce como neovascularización.

5 La expresión "enfermedad relacionada con la angiogénesis" se relaciona con todas aquellas enfermedades donde la angiogénesis patógena ocurre, por ejemplo, cuando dicho proceso es dañino o indeseable, ya sea canceroso o no. El alcance de la presente invención excluye así el tratamiento de angiogénesis en situaciones donde es necesario, como la cicatrización de heridas. Enfermedades asociadas a una angiogénesis no deseada que puede tratarse con los compuestos de acuerdo con la presente invención, sin limitación, son enfermedades inflamatorias, especialmente enfermedades crónicas inflamatorias como la artritis reumatoide, la psoriasis, sarcoidosis y similares; enfermedades autoinmunes; enfermedades virales; enfermedades genéticas; enfermedades alérgicas; enfermedades bacterianas; enfermedades oftalmológicas como la retinopatía diabética, Retinopatía prematura, retinopatía auricular proliferativa, oclusión de la vena retiniana, degeneración macular, degeneración macular discoide senil, glaucoma ocular neovascular, enfermedades de la neovascularización coroidea, enfermedades de la neovascularización de la retina, rubeosis (neovascularización angular), rechazo del injerto corneal, fibroplasia retrolental, epidérmica, queratoconjuntivitis, deficiencia de vitamina A, agotamiento de las lentes de contacto, queratitis atópica, queratitis límbica superior, ojo seco de pterigio, síndrome de Sjogren, acné rosácea, flictenulosis, sífilis, infecciones micobacterianas, degeneración lipídica, quemaduras con sustancias corrosivas, úlceras bacterianas, úlceras micóticas, infecciones por protozoos, Kaposi sarcoma, úlcera de Mooren, degeneración marginal de Terrien, queratolisis marginal, escleritis, desprendimiento de retina crónico y similares; aterosclerosis; endometriosis; obesidad; insuficiencia cardíaca; Insuficiencia renal avanzada; endotoxemia; shock tóxico síndrome; meningitis; fibrosis inducida por silicio; fibrosis inducida por el asbesto; apoplejía periodontitis; gingivitis; anemia macrocítica; anemia refractaria; condiciones donde la vascularización se altera como infección por VIH, hepatitis, telangiectasia hemorrágica o enfermedad de Rendu-Osler-Weber.

En una realización preferida, la enfermedad asociada a una angiogénesis no deseada. Es una enfermedad seleccionada de cáncer, artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, diabética. retinopatía, retinopatía prematura, oclusión de la vena retiniana, disco macular senil degeneración, aterosclerosis, endometriosis y obesidad, preferentemente cáncer.

En una realización particular, las enfermedades asociadas a una angiogénesis no deseada son enfermedades inflamatorias. Se entiende por "enfermedad inflamatoria" cualquier enfermedad cuando hay una respuesta inflamatoria excesiva o alterada que conduce a una inflamación. Los síntomas de dichas enfermedades inflamatorias que pueden tratarse con compuestos de la invención incluyen, sin limitación, enfermedad de Addison, acné vulgar, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, ulceraciones, estomatitis aftosa, artritis, arteriosclerosis, artrosis, artritis reumatoide, asma bronquial, enfermedad de Bechet, Enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, crioglobulinemia, degeneración macular, dermatitis, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, diabetes dependiente de la insulina, diabetes juvenil, enfermedad desmielinizante inflamatoria, contractura de Dupuytren, encefalomielitis, alergia Encefalomielitis, endoftalmia, enteritis alérgica, enteropatía autoinmune síndrome, eritema nudoso leproso, espondilitis anquilosante, facial idiopática parálisis, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, fibrosis quística, gingivitis, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Hashimoto, hepatitis crónica, histiocitosis, ileitis regional, iritis, lupus eritematoso diseminado, lupus sistémico eritematoso, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia gravis, mielitis transversa, idiopática primaria, mixedema, nefrosis, obesidad, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, paniculitis, pénfigo vulgar, periodontitis, poliarteritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, polirradiculitis aguda, psoriasis, obstructiva crónica, enfermedad pulmonar, púrpura, pioderma gangrenosa, síndrome de Reiter, diabetes, retinopatía, rosácea, sarcoidosis, esclerosis ataxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, uveítis anterior aguda, vitiligo, enfermedad de Whipple, enfermedades asociadas al SIDA, enfermedades graves combinadas inmunodeficiencia y el virus de Epstein Barr, como el síndrome de Sjogren, la osteoarticular Tuberculosis y enfermedades parasitarias como la leishmaniasis. Las enfermedades preferidas inflamatorias son la artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, retinopatía diabética, degeneración macular, arteriosclerosis y obesidad.

En otra realización preferida, la enfermedad es cáncer.

Los términos "cáncer" y "metástasis" se relacionan con la condición fisiológica en mamíferos caracterizados por el crecimiento celular no regulado. Los polipéptidos triméricos de acuerdo con la invención son útiles para el tratamiento de cualquier cáncer o tumor, tal como, sin limitación, mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, esplénico, riñón, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, hueso, tumores de médula ósea, sangre, timo, útero, testicular e hígado. En particular, los tumores que se pueden tratar con dichos anticuerpos que incluyen, entre otros, adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma,

hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, Rbdomiosarcoma, sarcoma y teratoma. Particularmente, se selecciona el tumor / cáncer del grupo de melanoma lentiginoso acral, adenocarcinoma de queratosis actínica, carcinoma adenoide quístico, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartholin, carcinoma de células basales, glándula bronquial carcinoma, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, cistoadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, estroma endometrial sarcoma, adenocarcinoma endometriode, sarcoma endometrial, sarcoma de Swing, Hiperplasia nodular focal, tumores de la línea germinal, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinooma, neoplasia intraepitelial, interepitelial escamosa neoplasia de células, carcinoma de células escamosas invasivas, carcinoma de células grandes, leiomiomasarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, papilar seroso adenocarcinoma, tumores hipofisarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rbdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, tumor de Wilm. En una realización de la presente invención, el tumor se selecciona del grupo que consiste en: carcinoma de mama, próstata carcinoma, carcinoma de pulmón, carcinoma colorectal, carcinoma pancreático, renal carcinoma, carcinoma gástrico, carcinoma de ovario, carcinoma papilar de tiroides, melanoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vejiga, liposarcoma invasivo carcinoma, neuroblastoma, carcinoma escamoso esofágico, osteosarcoma, vesícula biliar carcinoma, carcinoma escamoso oral, carcinoma de endometrio y meduloblastoma.

Tal como se usa en el campo farmacéutico convencional, la presente invención incluye un método en el que el TPC de la invención o un polipéptido monómero de acuerdo con la invención se administra por una ruta seleccionada del grupo que consiste en vía intravenosa, la vía intraarterial, la vía transmembrana bucal, anal o tejido vaginal, vía intranasal, vía intravítrea, vía pulmonar, vía transdérmica, vía intramuscular, vía subcutánea, vía intratecal, vía oral, ruta de inoculación en tejido como un tumor, o mediante un implante.

Un uso adicional de acuerdo con la invención incluye el uso del TPC de la invención para administrar in vitro un agente de formación de imágenes a una célula o tejido diana. El TPC de la invención puede comprender al menos un resto heterólogo que permita dirigirse in vitro a una célula o tejido, un fragmento de anticuerpo como el descrito anteriormente, y un agente de imagen.

El término "agente de imágenes" y "agente de contraste", se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a un compuesto biocompatible, cuyo uso facilita la diferenciación de diferentes partes de la imagen, al aumentar el "contraste" entre las diferentes regiones de la imagen. El término "agentes de contraste" abarca así los agentes que se utilizan para mejorar la calidad de una imagen que, no obstante, puede generarse en ausencia de dicho agente (como es el caso, por ejemplo, en MRI), así como los agentes que necesitan requisitos previos para la generación de una imagen nuclear como es el caso, por ejemplo, en imágenes de agentes de contraste adecuados incluyen, sin limitación, agentes de contraste para imágenes de radionúclidos, para tomografía computarizada, para espectroscopia Raman, para imágenes de resonancia magnética (MRI) y para imágenes ópticas.

Los agentes de contraste para la obtención de imágenes con radionúclidos incluyen iones de yodo¹²³, technicium⁹⁹, indio¹¹¹, renio¹⁸⁸, renio¹⁸⁶, cobre⁶⁷, yodo¹³¹, itrio⁹⁰, yodo¹²⁵, astatine²¹¹, galio⁶⁷, iridio¹⁹², cobalto⁶⁰, radio²²⁶, oro¹⁹⁸, cesio¹³⁷ y fósforo³².

Los ejemplos de agentes fluorogénicos incluyen gadolinio y renographin. Ejemplos de iones paramagnéticos incluyen cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), 3 cobalto (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), iones holraium (III) y erbio (III).

Los agentes de contraste para la obtención de imágenes ópticas incluyen, por ejemplo, un derivado de la fluoresceína, verde de indocianina, verde de Oregón, un derivado del verde de Oregón, rodamina verde, un derivado de rodamina verde, una eosina, una eritrosina, Texas rojo, un derivado de Texas rojo, malaquita verde, nanogold sulfosuccinimidyl ester, cascada azul, un derivado de cumarina, un naftaleno, un derivado de piridiloxazol, cascada colorante amarillo, colorante dapoxilo y otros diversos compuestos fluorescentes descritos en el presente documento.

Agente de contraste para aparatos de resonancia magnética quelatos de gadolinio, quelatos de manganeso, quelatos de cromo, ¹⁹F y partículas de hierro.

Los agentes de contraste para MRI incluyen complejos de metales seleccionados del grupo que consiste en cromo (III), manganeso (II), hierro (II), hierro (III), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (V), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III).

5 Finalmente, la presente invención también se relaciona con el campo del diagnóstico como el que una persona experta reconocería fácilmente que el XVIIIITSE aquí descrito también se refiere a un método de diagnóstico que comprende un TPC de la invención junto con un componente de diagnóstico acoplado en el mismo.

10 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para la formación de imágenes de una célula diana que comprende poner en contacto dicha célula con un TPC de la invención en el que dicho TPC comprende un primer resto heterólogo como agente de formación de imágenes y un segundo resto heterólogo, que es una molécula para la cual están presentes sitios de unión específicos en la célula diana.

15 El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe considerarse como limitante del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

20 **Generación y caracterización de complejos de polipéptido triméricos funcionales (TPCs) C-terminales, N-/C-terminales y N-/C terminales monocadena**

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos.

25 Los anticuerpos monoclonales (mAbs) utilizados incluyeron el 9E10 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), específico para la etiqueta c-myc, OKT3 (Janssen-Cilag Pty Limited, EE. UU.), específico frente CD38 humano, el MAb anti-CD69 humano conjugado con PE (clon FNSO, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y ratón anti-BSA mAb B2901 (Sigma-Aldrich).

30 Los anticuerpos policlonales frente a albúmina sérica anti-bovina de conejo (BSA), IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), y un conjugado con HRP IgG anti-ratón de cabra (Fc específico) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). IRDye800 IgG anti-ratón conjugado (H&L) de Rockland Immunochemistry (Gilbertsville, PA, EE. UU.). Laminina extraída del tumor de ratón Holm-Swarm (EHS) fue de Invitrogen (Carlsbad, CA). BSA econjugada con 4-hidroxi-5-yodo-3-nitrofenilo (NIP) (Sigma-Aldrich) en una proporción molar de 10: 1 (NIP:BSA) como se describió anteriormente [Cuesta AM, et al. In Vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences. PLoS One. 2009;4(4):e5381].

Células y condiciones de cultivo.

40 Células HEK-293T (epitelios renales de embriones humanos; CRL-11268) se cultivaron en el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% (vol /vol) de suero de becerro fetal (FCS) inactivado por calor (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA), a menos que se indique lo contrario. Las células del clon Jurkat E6-1 (TIB-152) se mantuvieron en RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con FCS al 10% inactivado por calor, denominado RPMI medio completo (RCM). Todas estas líneas celulares se obtuvieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE.UU.).

Construcción de vectores de expresión.

TPC N-terminales con dominio de trimerización del colágeno XVIII humano:

50 El fragmento de ADN [SEC ID NO: 2] que codifica la región de trimerización del dominio NCI del colágeno XVIII humano [SEC ID NO: 1] fue codón optimizado y sintetizado por GeneArt AG (Regensburg, Alemania), con un enlazador GS N-terminal [SEQ ID NO: 16] y las etiquetas C-terminal c-myc y hexahistidina.

Esta construcción se subclonó a través de NotI / XbaI en el vector pCR3.1-L36 [Sanz L., et al. Single-chain antibody-based gene therapy: Inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived antibodies blocking functionally active sites of cell-associated matrices. Gene Ther (2002) 9: 1049-1053] para generar el vector pCR3.1-L36-hNC1, que codifica el polipéptido monómero que constituye el TPC N-terminal identificado como L36-TN en esta descripción, que comprende el scFv L36 que contiene la región variable de la cadena pesada (VH) fijada con un enlazador (Gly₄Ser)₃ [SEQ ID NO: 3] a la región variable de la cadena ligera (VL), donde el extremo C-terminal de dicho scFv L36 está vinculado al extremo N-terminal de la región de trimerización NCI de colágeno XVIII humano a través de dicho enlazador peptídico flexible [SEC ID NO: 16]. los TPC terminales de otras especificidades, por ejemplo, B.18-TN, fueron fácilmente construidos subclonando el scFv correspondiente [Alvarez-vallina et al. Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment CD28 receptors. Eur. J. Immunol. (1996) 26:2304-2309.] a través de ClaI / NotI [Cuesta AM, et al. In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences. PLoS One. 2009;4(4):e5381] en el vector pCR3.1-L36-hNC1.

TPC C-terminales con dominio de trimerización del colágeno humano XVIII

El fragmento de ADN que codifica la región de trimerización NCI del colágeno humano XVIII dominio [SEC ID NO: 1], un enlazador GS [SEC ID NO: 4] y el anticuerpo anti-laminina scFv L36 (VH-VL) fue codificado, optimizado y sintetizado por GeneArt AG. Este constructo se subclonó a través de Clad / MOI en el vector pCR3.1-L36 para generar el vector pCR3.1-hNC1-L36, que codifica el polipéptido monómero que constituye el TPC C-terminal identificado como L36-TC en esta descripción, que comprende el scFv del anticuerpo L36, en donde el extremo N-terminal de dicho scFv anticuerpo L36 está vinculado al extremo C-terminal de la región de trimerización NCI del colágeno humano XVIII a través de un enlazador de péptidos flexible [SEC ID NO: 4].

El fragmento de ADN [SEC ID NO: 2] que codifica la región de trimerización del dominio NCI del colágeno humano XVIII [SEC ID NO: 1], un enlazador GS [SEC ID NO: 17] y el scFv del anticuerpo anti-CD3 OKT3 (VH-VL) fue codón optimizado y sintetizado por GeneArt AG. Este constructo fue subclonado a través de BamHI / XbaI en el vector pCR3.1-hNC1-L36 para generar el vector pCR3.1-hNC1-OKT3, que codifica el polipéptido monómero que constituye el TPC C-terminal identificado en esta descripción como OKT3-TC, que comprende el scFv del anticuerpo anti-CD3 OKT3 en el que el extremo N-terminal de dicho scFv está vinculado al extremo C-terminal del dominio NCI de la región de trimerización del colágeno humano XVIII a través de un enlazador peptídico flexible [SEC ID. NO: 17].

TPC N / C-terminal monocadena con dominio de trimerización del colágeno XVIII humano

El TPC mono-específico N / C terminal de L36 fue generado por clonación del fragmento de ADN que codifica el conector flexible [SEC ID NO: 4] y el scFv anti-laminina de anticuerpo L36 de pCR3.1-hNC1-L36 en el vector pCR3.1-L36-hNC1, a través de BamHI / XbaI, para generar el vector pCR3.1-L36-hNC1-L36, codificando el polipéptido monómero que constituye el TPC N / C-terminal monocadena identificado como L36-T-L36 en esta descripción, que comprende (i) el scFv del anticuerpo L36, en donde el extremo C-terminal de dicho scFv está vinculado al extremo N-terminal de la región de trimerización NCI del colágeno humano XVIII [SEC ID NO: 1], a través de un enlazador peptídico flexible [SEC ID NO: 16], y (ii) el scFv del anticuerpo L36 en el que el N-terminal de dicho anticuerpo L36 está vinculado al extremo C-terminal del dominio de trimerización NCI del colágeno humano XVIII a través de un enlazador peptídico flexible [SEC ID NO: 4].

Se generó el TPC biespecífico monocatenario N / C de L36 y OKT3 clonando el fragmento de ADN que codifica el enlazador flexible [SEC ID NO: 4] y el scFv del anticuerpo anti-CD3 humano OKT3 en el vector pCR3.1-L36-hNC1, a través de BamHI / XbaI, para generar el vector pCR3.1-L36-hNC1-21-OKT3, codificando el polipéptido monómero que constituye el TPC N / C terminal monocadena. identificado como L36-T-OKT3 en esta descripción, que comprende (i) el scFv del anticuerpo L36, en donde el extremo C-terminal de dicho scFv está vinculado al extremo N-terminal del dominio de trimerización NCI del colágeno humano XVIII, a través de un conector peptídico flexible [SEC. ID NO: 16], y (ii) el scFv del anticuerpo OKT3 en el que el extremo N-terminal de dicho anticuerpo OKT3 está vinculado al extremo C-terminal del dominio de trimerización del colágeno humano XVIII a través de un enlazador flexible [SEC ID NO: 4].

Transfecciones celulares y expresión de anticuerpos recombinantes.

Las células HEK-293T se transfectaron con los vectores de expresión apropiados, utilizando Superfect (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Sobrenadantes de las poblaciones de células transfectadas transitoriamente se recogieron después de 48-72 h y se analizaron para determinar la proteína y se analizó la expresión por ELISA y transferencia de Western usando anti-myc mAb 9E10.

ELISA

Los sobrenadantes limpios se incubaron en placas de microtitulación (Nunc, Dinamarca), previamente recubiertos con 10 µg / ml de laminina y bloqueados con 5% de leche / PBS. Las proteínas se detectaron mediante el mAb 9E10 anti-myc de ratón. Para probar biespecificidad, las proteínas se detectaron utilizando BSA conjugado con NIP y mAb anti-BSA de ratón B2901 (Sigma-Aldrich).

Western Blot

El sobrenadante puro se separó mediante la reducción de SDS-PAGE en geles tris-glicina al 4-20%. (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después del bloqueo con solución de bloqueo LI-COR (LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.), Las proteínas se detectaron con mAb 9E10 anti-myc de ratón y burro anti-ratón IgG (H&L) IRDye800 conjugado. Las imágenes fueron tomadas usando un sistema de imagen infrarrojo Odyssey (LI-COR).

Citometría de flujo

La capacidad de los diferentes TPC que contienen el scFv derivado de OKT3 para reconocer su antígeno (CD3ε) en células se probó marcando células Jurkat con muestras de proteína y detección con mAb anti-myc 9E10 de ratón conjugado con ficoeritrina (PE). Todas las muestras fueron analizadas utilizando un EPICS (Citómetro de flujo XL de Beckman Coulter).

La capacidad de los diferentes TPCs para reticular y activar células Jurkat fue realizado en solución y en fase sólida. Para la activación en solución, las células Jurkat fueron mezcladas con TPCs mono-específicos o bio-específicos e incubado durante la noche. La activación celular se estimó detectando la expresión de CD69 en la superficie celular por el citometría, utilizando mAb CD69 antihumano conjugado con PE (FNSO). Para activación en fase sólida, se añadieron TPCs bio-específicos a los pocillos con laminina inmovilizada y se lavaron. Las células Jurkat se incubaron durante la noche y se procesaron como anteriormente se ha indicado.

Estabilidad del suero

Un microgramo de TPC N-terminal mono-específico purificado de L36 (L36-TN) se incubó en suero humano estéril a 37 ° C por intervalos y hasta 168 h. Las muestras fueron obtenidas para su análisis a las 8h, 24h, 48h, 72h y 168h después del inicio de la incubación y congeladas hasta completar todo el estudio. Como control, un segundo conjunto de muestras expuestas al suero se congelaron inmediatamente para representar un punto de tiempo cero. Las alícuotas se probaron para determinar su capacidad para unirse a laminina mediante ELISA, como se describe anteriormente.

II. RESULTADOS

Diseño y expresión de construcciones TPC.

Los inventores han demostrado previamente que los TPC de diferentes especificidades, incluyendo el anti-laminina L36 scFv, que contiene el dominio de trimerización NCI C-terminal de colágeno XVIII murino se produjeron en células HEK-293 en de forma homotrimérico y de forma funcionalmente activa [Sanchez-Arevalo Lobo (2006). *Int J Cancer*. 119: 455-62.]

En el presente estudio, los inventores han ampliado el alcance de los formatos TPC en diseño de construcciones con scFv C-terminales, anti-laminina, anti-CD3, L36 y OKT3, respectivamente, fusionándolos o vinculándolos al extremo C-terminal de la región de trimerización NCI del colágeno XVIII humano. Los complejos polipeptídicos triméricos (L36-TC y OKT3-TC) se secretaron como proteínas activas en células HEK-293T transfectadas con plásmidos que codifican TPC C-terminales, TPC N-terminales o cotransfectando con plásmidos que codifica TPCs C-terminales con diferentes especificidades, TPCs N-terminales con diferentes especificidades o ambos plásmidos TPC C-terminales y TPC N-terminales de forma conjunta. La eficacia de transfección se determinó mediante la transfección de células HEK-293T con el plásmido pEGFP-NI (Clontech) que codifica para la proteína de fluorescencia verde (GFP). El análisis de transferencia Western revela bandas de aproximadamente 38-40 kDa (Fig. 2A y 4A), el tamaño esperado de TPC C-terminal o polipéptidos monómeros de TPC N-terminales en SDS-PAGE desnaturizante.

Actividad de unión al antígeno

La capacidad de los TPC mono-específicos o bio-específicos N-terminales o C-terminales, TPCs N-/C-terminales mono-específicos o bio-específicos, y TPCs mono-específicos o bio-específicos N-/ C-terminales de cadena simple (monocadena) para reconocer sus antígenos afines se demostró mediante ELISA (construcciones derivadas de L36) y por citometría de flujo (construcciones derivadas de OKT3). Un ELISA con laminina inmovilizada (Fig. 2B, 3A, 4B y 5A) mostró que solo muestras que contenían L36 fueron capaces de unirse a este antígeno independientemente de su posición N- o C-terminal. En el ensayo de citometría de flujo, las células Jurkat se incubaron con sobrenadantes limpios y se detectaron con anti-myc mAb 9E10, los resultados revelaron que solo las construcciones que contienen OKT3 fueron capaces de detectar CD3ε en la superficie celular (Fig. 2C y 5B). El OKT3 en formato nativo (mAb) se utilizó como control positivo.

La bio-especificidad de los TPC N-terminales o C-terminales, los TPCs N-/ C-terminal, y los TPCs N / C-terminales monocadena se estudiaron mediante ELISA de sándwich como anteriormente se describió [Cuesta AM, et al. *In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences*. *PLoS One*. 2009;4(4):e5381]. Medio condicionado de células HEK-293T doble transfectadas se añadió a los pocillos recubiertos con laminina y, después del lavado, los TPCs unidos a la laminina fueron capaces de capturar NIP-BSA soluble (Fig. 3B). Estudios del sobrenadante de una sola transfección de las células HEK-293T transfectadas demostraron que el TPC se une a la laminina, pero el TPC unido no captura, a su vez, NIP-BSA (Fig. 3B).

El TPC anti-laminina monocadena (L36-T-L36) y el TPC bio-específico anti-laminina y anti-CD3 monocadena (L36-T-OKT3) se secretaron como proteínas funcionales en las células HEK-293T, tan eficientemente como los TPCs N-terminal, C-terminal y N-/C-terminal anti-laminina (fig. 4 y 5). El análisis de transferencia Western reveló una banda de 65-70 kDa (Fig. 4A), tamaño esperado de un monómero TPC monocadena en SDS-PAGE desnaturizante. Aunque la cantidad de L36-T-L36 expresada fue ligeramente inferior a los TPC control, su capacidad para reconocer la laminina inmovilizada en plástico parecía ser mayor por ELISA (Fig. 4B) y da una indicación de su hexavalencia. Los TPCs de una sola cadena bio-específicos anti-laminina y anti-CD3 (L36-T-OKT3) reconocieron ambos antígenos, lamininas inmovilizada a plástico (Fig. 5A) y CD3ε en la superficie celular de las células T Jurkat humanas (Fig. 5B).

Estabilidad in vitro

La estabilidad de los fragmentos de anticuerpos diseñados en suero es el parámetro crítico. para determinar su aplicación potencial in vivo [Cuesta AM et al. Trends Biotech. 2010, 28:355-62]. La especificidad del TPC monoespecífico N- terminal (L36-TN) derivado de L36, se examinó después de la incubación en suero humano a 37 °C durante períodos prolongados de tiempo. Como se muestra en la Fig. 6, el TPC L36-TN purificado retuvo el 55% de su capacidad biológica después de un período de incubación de 7 días en suero humano en condiciones de temperatura fisiológica. Esta actividad biológica retenida es una mejora substancial sobre el anterior formato de fragmentos de anticuerpos triméricos scFv-Col informados [EP 2065402], que retuvieron solo el 40% de su actividad biológica después de una incubación de 7 días en suero humano a 37 °C.

CONCLUSIONES

Se ha demostrado la posibilidad de producir funcionalmente TPCs activos:

1. TPC C-terminales mono y biespecíficos.
2. TPC mono y biespecíficos N-/C-terminales.
3. TPC mono y biespecíficos, hexavalentes de una sola cadena. Esto abre la posibilidad de hacer fácilmente biespecíficos (o incluso, por ejemplo, trispecíficos, tetraspecíficos, etc.) multivalentes (por ejemplo, divalente, trivalente, tetravalente, pentavalente o hexavalente) y varias otras combinaciones.

ES 2 701 445 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Leadartis, S.L.

<120> GENERACIÓN DE COMPLEJOS POLIPEPTIDICOS MULTIFUNCIONALES Y MULTIVALENTES MEDIANTE EL DOMINIO DE TRIMERIZACIÓN DEL COLAGENO XVIII

<130> P6424PC00

<150> EP 10382270.6

<151> 2010-10-15

<150> EP 10382271.4

<151> 2010-10-18

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 59

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Gly Val Arg Leu Trp Ala Thr Arg Gln Ala Met Leu Gly Gln Val
1 5 10 15

His Glu Val Pro Glu Gly Trp Leu Ile Phe Val Ala Glu Gln Glu Glu
20 25 30

Leu Tyr Val Arg Val Gln Asn Gly Phe Arg Lys Val Gln Leu Glu Ala
35 40 45

Arg Thr Pro Leu Pro Arg Gly Thr Asp Asn Glu
50 55

<210> 2

<211> 177

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tcaggggtga ggctctgggc tacacgccag gccatgctgg gccaggtgca cgaggttccc 60

gagggctggc tcatcttcgt ggccgagcag gaggagctct acgtccgcgt gcagaacggg 120

ttccggaagg tccagctgga ggcccggacg ccaactcccac gagggacgga caatgaa 177

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador peptidico flexible

ES 2 701 445 T3

<400> 3

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

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

<400> 4

Gly Ser Ser Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Ser Asp Gly
1 5 10 15

Ala Ser Gly Arg
20

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

<400> 5

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

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

<400> 6

Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr
1 5 10 15

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

<400> 7

Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro

ES 2 701 445 T3

<220>

<223> Enlazador peptídico flexible

<400> 12

Ala Asn Ser Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Ser Asp Gly
1 5 10 15

Ala Ser Gly Ser Arg
 20

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

<400> 13

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser
1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

<400> 14

Ala Pro Ala Glu Thr Lys Ala Glu Pro Met Thr
1 5 10

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

<400> 15

Ala Ala Ala Leu Glu
1 5

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Espaciador peptídico flexible

ES 2 701 445 T3

<400> 16

Ala Ala Ala Asn Ser Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Asp Gly Ala Ser Gly
 20

<210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Espaciador peptidico flexible

<400> 17

Gly Ser Ser Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Ser Asp Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Arg Leu
 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Espaciador peptidico flexible

<400> 18

Asn Ser Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Gly Ser Asp Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ser Arg
 20

<210> 19
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 19

His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn
 1 5 10 15

Thr Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln
 20 25 30

Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ser Gly Thr Phe Arg Ala

REIVINDICACIONES

1. Un complejo polipeptídico trimérico que comprende tres polipéptidos monómeros, en donde (i) cada uno de dichos polipéptidos monómeros comprende un elemento estructural trimerizante del colágeno XVIII (XVIIIITSE), en el que dicho XVIIIITSE comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente que tiene la capacidad de formar trímeros, en donde dicha variante equivalente funcional muestra un grado de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID. NO: 1 de al menos el 30%, y (ii) al menos uno de dichos polipéptidos monómeros está covalentemente unido al menos a un resto heterólogo, en el que dicho resto heterólogo está posicionado en el extremo C-terminal respecto a dicho polipéptido monómero.
2. Complejo polipeptídico trimérico según la reivindicación 1, en el que dicho resto heterólogo es un anticuerpo o un fragmento recombinante del mismo, o una etiqueta.
3. Complejo polipeptídico trimérico según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido monómero está unido a dicho resto heterólogo a través de un espaciador.
4. Complejo polipeptídico trimérico según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido monómero está unido covalentemente a dos o más restos heterólogos; en donde dichos dos o más restos heterólogos son, independientemente, iguales o diferentes entre sí.
5. Complejo polipeptídico trimérico según la reivindicación 4, en el que al menos un resto heterólogo se coloca en el extremo C-terminal respecto a dicho polipéptido monómero y al menos un resto heterólogo se coloca en posición N-terminal, respecto a dicho polipéptido monómero, o alternativamente, en donde dichos dos o más restos heterólogos están posicionados en el extremo C-terminal respecto a dicho polipéptido monómero.
6. Complejo polipeptídico trimérico según la reivindicación 1, que comprende un primer polipéptido monómero unido covalentemente al menos a un resto heterólogo y un segundo polipéptido monómero unido covalentemente al menos a un resto heterólogo.
7. Complejo polipeptídico trimérico según la reivindicación 1, en el que cada uno de los tres polipéptidos monómeros está unido covalentemente al menos a un resto heterólogo.
8. Un polinucleótido que codifica un polipéptido monómero, dicho polipéptido monómero comprende un elemento estructural trimerizante del colágeno XVIII (XVIIIITSE) y está covalentemente unido a al menos un resto heterólogo, en el que dicho resto heterólogo es un polipéptido y dicho resto heterólogo está posicionado en el extremo C-terminal respecto a dicho polipéptido monómero, en el que el polipéptido monómero está definido en la reivindicación 1.
9. Un proceso para producir un complejo polipeptídico trimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende aislar dicho complejo polipeptídico trimérico de un cultivo que comprende una célula huésped que expresa y transporta un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9, que codifica al menos uno de los polipéptidos monómeros de dicho complejo trimérico y opcionalmente someter el complejo polipéptido trimérico a procesamiento posterior.
10. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende un complejo polipeptídico trimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, un vector que comprende dicho polinucleótido de la reivindicación 8, o una célula que comprende dicho polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8 o dicho vector que comprende dicho polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
12. Un complejo polipeptídico trimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho complejo trimérico comprende al menos un resto heterólogo, en el que dicho resto heterólogo es un compuesto anti-angiogénesis para uso en la prevención y / o tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis.
13. Uso de un complejo polipeptídico trimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como un vehículo para que los fragmentos de anticuerpos ensamblados generen un anticuerpo quimérico artificial con propiedades farmacocinéticas y / o farmacodinámicas preseleccionadas.

ES 2 701 445 T3

14. Uso de un complejo polipeptídico trimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para administrar in vitro un agente de contraste a una célula o tejido objetivo.

5 DIBUJO EP 11 770 449.4 (19.04.2012) 1/6 -> 2/6 WO 2012/049328 PCT / EP2011 / 068126

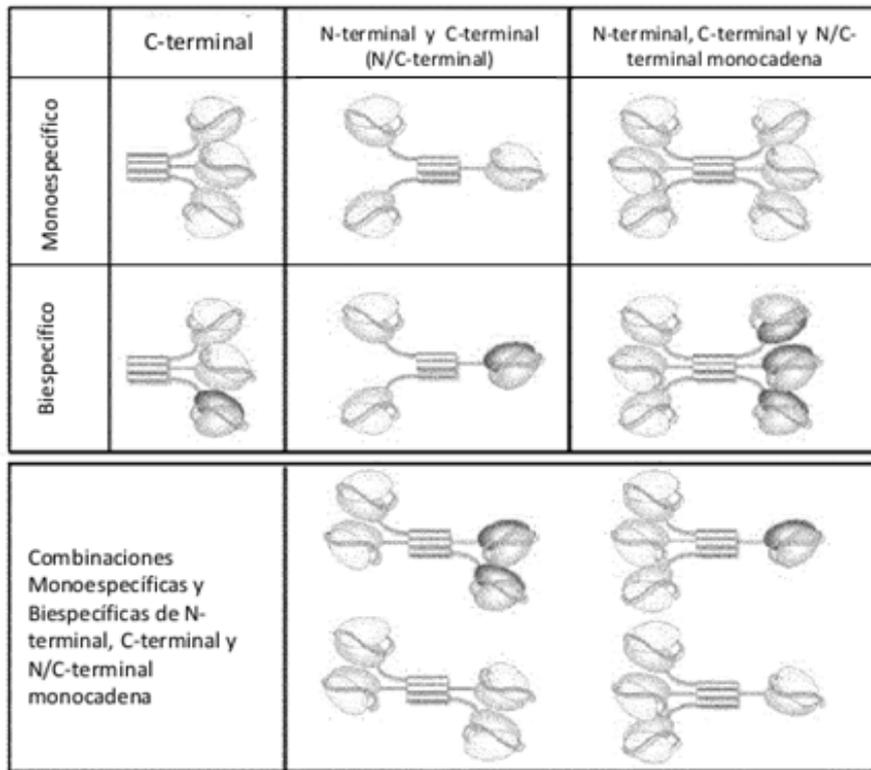


Fig. 1

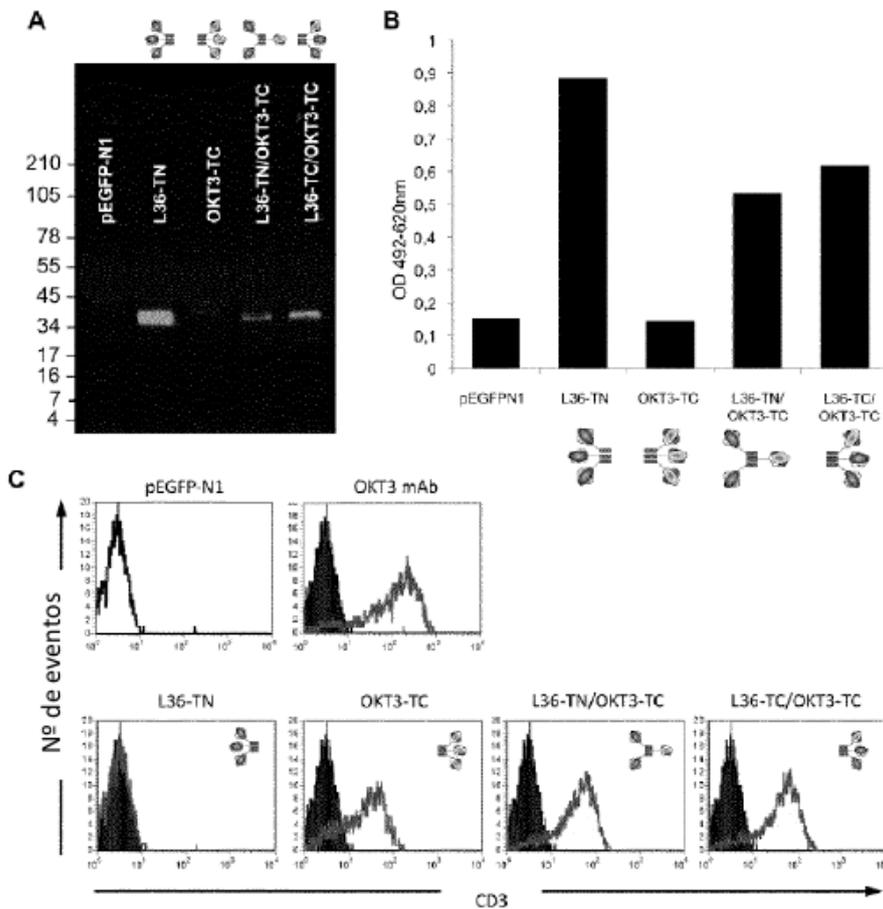


Fig. 2

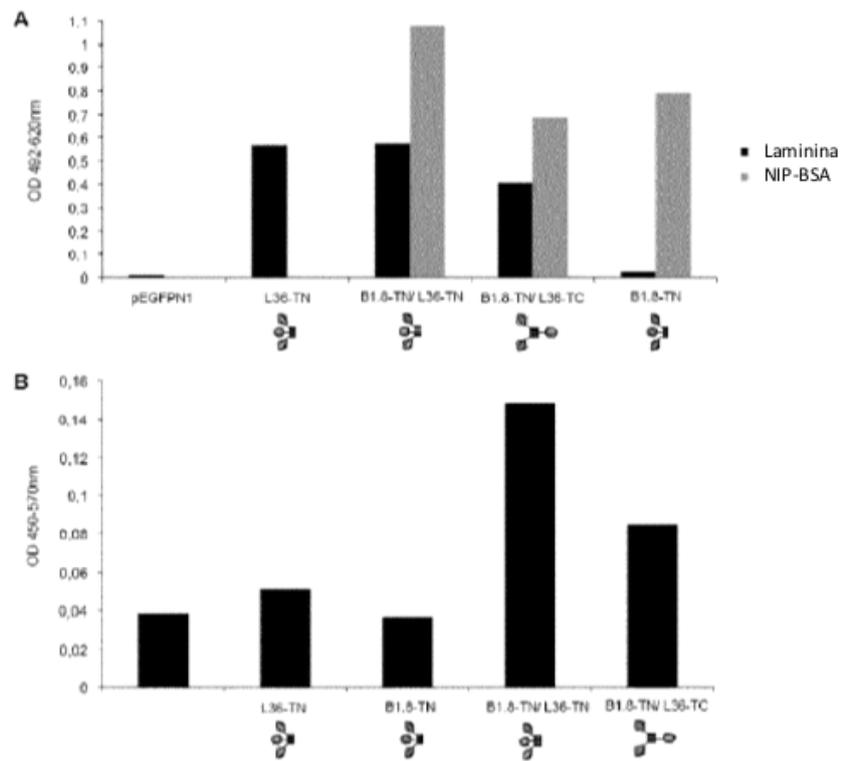


Fig. 3

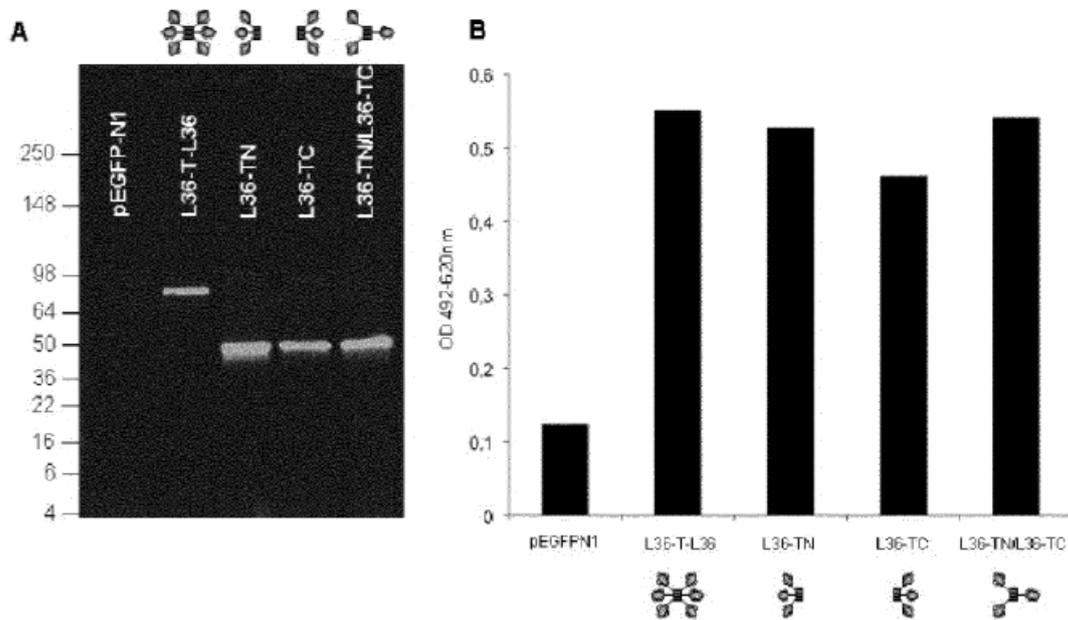


Fig. 4

