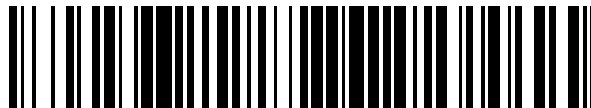


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 535**

51 Int. Cl.:

B01J 19/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2014 PCT/GB2014/051881**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14202984**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014 E 14734542 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3010935**

54 Título: **Método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad**

30 Prioridad:

20.06.2013 GB 201311031

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

25.04.2019

73 Titular/es:

QUEEN MARY UNIVERSITY OF LONDON (100.0%)

Mile End Road

London Greater London E1 4NS, GB

72 Inventor/es:

NISSIM, AHUVA;

MARSHALL, JOHN y

HOWARD, MARK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 710 535 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

Método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad contra una proteína diana.

Antecedentes de la invención

10

Los programas de descubrimiento de anticuerpos se han vuelto una fuente importante tanto de biomoléculas terapéuticas como de reactivos de investigación. Sin embargo, el proceso de obtención de anticuerpos específicos, particularmente para su uso en terapia, sigue siendo lento y empírico.

15

La base genética de la diversidad estructural de los anticuerpos está parcialmente codificada en la línea germinal, pero también es el resultado de sucesos genéticos estocásticos, incluyendo reordenamientos cromosómicos, inserciones de nucleótidos sin molde e hipermutación somática. La mayoría de esta diversidad se localiza en las regiones de anticuerpo pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L), y principalmente en las regiones determinantes de complementariedad (las CDR), que son los bucles de seis péptidos que sobresalen del armazón del dominio variable para formar la superficie de combinación con el antígeno de la molécula de anticuerpo. La cadena pesada contribuye con tres bucles CDR (V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3) y tres la cadena ligera (V_L -CDR1, V_L -CDR2 y V_L -CDR3). CDR1 y CDR2 están codificadas en la línea germinal y, por lo tanto, están relativamente limitados en su diversidad. V_L -CDR3 se forma durante la recombinación de los fragmentos genómicos de la cadena ligera V y J, mientras que V_H -CDR3 se forma por dos reordenamientos genéticos consecutivos, primero entre D y J y después entre V y DJ. Este reordenamiento está acompañado adicionalmente por la adición de nucleótidos sin molde, lo que hace de V_H -CDR3 la fuente de la mayoría de la diversidad de anticuerpos naturales.

20

25

El uso de bibliotecas combinatorias de fragmentos variables monocatenarios (scFv) por presentación en fagos para la generación de anticuerpos terapéuticos, está bien establecido y ha dado lugar a reactivos valiosos desde el punto de vista clínico. Las bibliotecas de scFv se preparan a partir de linfocitos B inmunocompetentes o indiferenciado, o como bibliotecas sintéticas donde los segmentos génicos de V_H y V_L del anticuerpo se reordenan *in vitro* con CDR sintéticos que codifican secuencias aleatorias de longitudes variables. Una desventaja de los métodos anteriores, sin embargo, es que los ligandos de scFv específicos de diana pueden unirse a cualquier epítipo en el antígeno diana. En el caso del desarrollo de reactivos de afinidad para aplicaciones terapéuticas, existe la necesidad de desarrollar una tecnología de plataforma más robusta que tenga la capacidad de desarrollar reactivos que tengan eficacia terapéutica y, por lo tanto, se unan a la fracción activa del antígeno diana.

30

35

Van Den Beucken *et al.*, 2001, describen ligandos de unión a B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) a base de dominios VL individuales. Se describe una biblioteca de VL en la que se enriquecieron genes de VL humanos procedentes de linfocitos B con el bucle similar a CFR3 de CTLA-4 y se diversificaron adicionalmente mediante "barajado" de ADN. *Journal of Molecular Biology*, vol. 310, n.º 3, 1 de julio de 2001, páginas 591-601.

40

Hausner *et al.*, 2007, describen el uso del péptido A20FMDV2 obtenido del virus de la fiebre aftosa para obtener imágenes *in vivo* de la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_6$ con tomografía por emisión de positrones. *Molecular Cancer Therapy*, vol. 8, n.º 5, mayo de 2009, páginas 1239-1249.

45

Descripción de las figuras

Figura 1 - Representación esquemática del diseño de las bibliotecas.

50

Se muestra la secuencia de aminoácidos y la estructura en solución por RMN de A20FMDV2 con una estructura de horquilla con el RGD en la punta del giro seguido de una hélice C-terminal (a). A partir de estos datos, se diseñaron dos algoritmos de V_H -CDR3 codificando una horquilla que contiene en su giro, un motivo RGD, seguido de una hélice α C-terminal (b) o una hélice 3_{10} (c); Se destacan las posiciones de aminoácido que están disponibles para la aleatorización (X y Z mostrados en azul y rojo, respectivamente).

55

Figura 2 - Exploración de clones de fagos.

60

a) Exploración por ELISA representativa para los ligandos a clones de scFv, analizando 96 clones en cada biblioteca. Se añadieron sobrenadantes bacterianos a $\alpha_v\beta_6$ recombinante 5 $\mu\text{g/ml}$ inmovilizada en una placa ELISA y después se sondaron con anticuerpo anti-Myc de ratón seguido de anti-ratón-HRP. Las bibliotecas se exploraron solas o mezcladas. b) Todos los ligandos fuertes singulares se analizaron a 100 (histograma rojo), 10 (histograma naranja) y 1 (histograma verde) $\mu\text{g/ml}$ en cuanto a la unión a $\alpha_v\beta_6$ celular por citometría de flujo. Además, se muestran el anticuerpo específico para $\alpha_v\beta_6$ 10D5 (histograma gris claro) y la IgG de control (histograma gris oscuro). c) El perfil de cromatografía de exclusión por tamaño de D25scFv y D34scFv purificados.

65

Figura 3 - Eficacia de unión a $\alpha V\beta 6$ celular de D25scFv, D34scFv, D25p y D34p.

(a) Unión a A375P $\beta 6$ demostrada por citometría de flujo. Se muestran los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) registrados a partir de experimentos representativos. Se usaron células A375Puro para el control negativo (puro). Inhibición dependiente de la dosis de la unión específica a $\alpha V\beta 6$ de A20FMDV2 (A20) con (b) ambos péptidos D25 (D25scFv) y D34 (D34scFv) y (c) D25p y D34p. La unión de A20FMDV2 se expresa como un porcentaje del valor de IFM detectado en ausencia de scFv o de inhibidores peptídicos. La adhesión dependiente de $\alpha V\beta 6$ a fibronectina fue inhibida por (d) D25scFv y D34scFv, y (e) D25p y D34p ($p = 0,0156$).

Figura 4 - Internalización de D25scFv, D34 scFv, D25p y D34p.

Internalización intracelular de D25scFv (a, b) y D34scFv (d, e) a 0 y 45 min en células que expresan $\alpha V\beta 6$ pero no en células negativas para $\alpha V\beta 6$. Para los controles negativos, se omitió el scFv primario (c,f). Internalización de D25p (g, h) y D34p (j,k) en células que expresan $\alpha V\beta 6$ a 0 y 45 min. En contraste con los scFv, no se observó localización nuclear con los péptidos. No se observó internalización de péptidos en las células negativas para $\alpha V\beta 6$ (i, l). La barra de escala mostrada representa 20 μm .

Figura 5 - Formación de imágenes tridimensionales de D25p radiomarcado *in vivo*.

La figura en el panel (a) representa un ratón representativo en el punto de tiempo de una hora, posinyección. Las tres imágenes representan tres ángulos de visión distintos: sagital (izquierda), frontal (centro) y transversal (derecha). Se localizó una mayor captación de tumor radioactivo en el tumor positivo para $\alpha V\beta 6$ (indicado con una flecha continua) que en el tumor negativo para $\alpha V\beta 6$ (indicado con la flecha discontinua). En el histograma (b) se muestran datos cuantitativos que muestran la dosis radiactiva promedio por gramo de tumor de los tres ratones analizados, en los puntos de tiempo de 1 h, 4 h y 24 h.

Figura 6 - Estructura de D25p y D34p por RMN.

Modelo de transformación a 3D para cada péptido basado en la media de 20 estructuras por RMN. Ambos péptidos presentaban el motivo de horquilla RGD-hélice. D34, que tiene 22 aminoácidos, tiene una hélice más corta que el péptido D25, que tiene 29 aminoácidos. Las hélices para ambos péptidos se definieron como una hélice α convencional con la hélice α de D34 extendiéndose desde Leu6-Leu17 y la hélice α de D25 extendiéndose desde Leu6-Gln25.

Figura 7 - Estrategia de clonación utilizada para construir la hélice α y 3_{10} de VH-CDR3 de las bibliotecas de presentación en fagos de scFv.

1) Usando el esqueleto del plásmido pHEN1 como molde de PCR, se amplificó el gen de VH-CDR3 con los cebadores LMB3 y el Cebador 1 o 2, que incluye la FR3, flanqueado por los algoritmos de hélice α o 3_{10} (respectivamente) y seguido por las secuencias de JH4.

2) Para incorporar un sitio de restricción Xho1 exclusivo, los productos de PCR obtenidos en la etapa 1 se amplificaron con LMB3 y Cebador 3.

Los productos de PCR resultantes de la etapa 2 se digirieron con NcoI y Xho1 para su inserción en el esqueleto del plásmido pIT2, que contiene el repertorio de cadenas ligeras.

Figura 8 - Contactos NOE (forma siglada de *nuclear Overhauser effect*: efecto Overhauser nuclear), diferencia de desplazamiento químico, donantes de puentes de hidrógeno y restricciones de diedro para el péptido D34p con TFE al 30 % p/v. La estructura secundaria mostrada debajo de las restricciones indica los límites de la formación de la hélice de acuerdo con el análisis de Ramachandran del conjunto final de 20 estructuras.

Figura 9 - Contactos NOE, diferencia de desplazamiento químico, donantes de puentes de hidrógeno y restricciones de diedro para el péptido D29p en TFE al 30 % p/v. La estructura secundaria mostrada debajo de las restricciones indica los límites de la formación de la hélice de acuerdo con el análisis de Ramachandran del conjunto final de 20 estructuras.

Sumario de aspectos de la invención

Los presentes inventores han desarrollado un método para generar un anticuerpo u otra biblioteca de reactivos de afinidad basándose en la estereoquímica óptima de una interacción de ligando:proteína diana. El método se basa en la generación de una biblioteca selectiva de diana mediante la incorporación de estructuras tridimensionales específicas en la porción de unión de un reactivo de afinidad (por ejemplo, el CRD (o los CRD) de un anticuerpo). Si las estructuras tridimensionales específicas corresponden a una interfaz ligando:proteína diana, es más probable que la exploración posterior de la biblioteca genere reactivos de afinidad que bloquearán la interacción ligando:receptor, en comparación con una biblioteca aleatoria convencional.

Como tal, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad contra una proteína diana que interactúa con un ligando, en donde la proteína diana es $\alpha V\beta 6$ y en donde el método comprende las siguientes etapas:

- i) generar una biblioteca de péptidos que comprenden una horquilla que contiene en su giro un motivo RGD seguido de una hélice α o una hélice 3_{10} C-terminal; y
 ii) injertar cada péptido de la biblioteca de péptidos en una porción de la molécula de reactivo de afinidad de forma que pueda interactuar con la proteína diana, para producir una biblioteca de reactivos de afinidad.

El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, en cuyo caso, en la etapa (ii) del método, el péptido puede injertarse en la posición de una región determinante de complementariedad (CDR) para producir una biblioteca de anticuerpos. La CDR puede ser CDR3. El péptido puede injertarse en lugar de una, dos o las tres CDR en el dominio variable de la cadena pesada y/o ligera.

La CDR puede ser V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, V_L -CDR1, V_L -CDR2 o V_L -CDR3. El método puede implicar injertar una o una pluralidad de bibliotecas de péptidos en una pluralidad de posiciones de CDR. La CDR puede ser CDR3, en particular V_H -CDR3.

El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo mimético, tal como un Affibody, una DARPin, una Anticalin, una Avimer, un Versabody o una Duocalin.

La proteína diana es $\alpha V\beta 6$.

La hélice α o hélice 3_{10} C-terminal puede comprender motivos de protección EP o QP N-terminal y/o LQEKGI C-terminal.

La hélice α C-terminal con motivos de terminación EP o QP N-terminal y LQEKGI C-terminal puede tener la secuencia;

$E_1P_2R_3G_4D_5L_6X_7X_8L_9A_{10}A_{11}R_{12}Z_{13}K_{14}R_{15}Z_{16}F_{17}N_{18}E_{19}Z_{20}L_{21}A_{22}Z_{23}L_{24}Q_{25}E_{26}K_{27}G_{28}I_{29}$ (SEQ ID NO: 1)

en donde X y Z son restos de aminoácido aleatorios.

La hélice 3_{10} con motivos de terminación EP N-terminal y LQEKGI C-terminal puede tener la secuencia;

$E_1P_2R_3G_4D_5L_6X_7X_8L_9A_{10}A_{11}Z_{12}L_{13}K_{14}Z_{15}E_{16}F_{17}Z_{18}E_{19}N_{20}Z_{21}L_{22}A_{23}Z_{24}L_{25}Q_{26}E_{27}K_{28}G_{29}I_{30}$ (SEQ ID NO: 2)

en donde X y Z son restos de aminoácido aleatorios.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar un reactivo de afinidad que tiene la capacidad de unirse a una proteína $\alpha V\beta 6$, método que comprende la etapa de fabricar una biblioteca de reactivos de afinidad contra la proteína $\alpha V\beta 6$ mediante el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención y explorar la biblioteca por la unión a la proteína $\alpha V\beta 6$.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 31. En el presente documento también se describen variantes de las mismas. La variante puede, por ejemplo, tener una o más inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácido. La variante puede tener 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o 1 mutaciones de aminoácido.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo para $\alpha V\beta 6$ que comprende una secuencia V_H -CDR3 que comprende un péptido de acuerdo con el tercer aspecto de la invención. Un anticuerpo que comprende un péptido variante debe conservar la capacidad de interactuar con $\alpha V\beta 6$. Un anticuerpo que comprende un péptido variante puede tener la capacidad de inhibir la unión de $\alpha V\beta 6$ a un péptido tal como el péptido A20FMDV2 (NAVPNLRGDLQVLQAKVART). Un anticuerpo que comprende un péptido variante puede tener la capacidad de inhibir la adhesión dependiente de $\alpha V\beta 6$ de células de carcinoma a fibronectina inmovilizada.

El anticuerpo puede usarse para diagnosticar o tratar una enfermedad.

La enfermedad puede ser cáncer o fibrosis.

El anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención puede conjugarse con un agente detectable y/o terapéutico.

El método descrito anteriormente proporciona un sistema más eficaz para la generación de anticuerpos específicos para terapia e investigación.

Descripción detallada

BIBLIOTECA DE REACTIVOS DE AFINIDAD

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad.

5 El reactivo de afinidad puede ser cualquier entidad que presente (o que pueda modificarse para presentar) un sitio de unión a una proteína diana. El sitio de unión a proteína diana debe presentarse en una configuración adecuada para la unión a la proteína diana, es decir, en una superficie externa de la molécula.

El reactivo de afinidad puede ser o comprender un péptido o polipéptido.

10 El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, o un anticuerpo mimético.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" significa un polipéptido que tiene un sitio de unión a antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad CDR. El anticuerpo puede comprender 3 CDR y tener un sitio de unión a antígeno que es equivalente al de un anticuerpo de un dominio (dAb). El anticuerpo
 15 puede comprender 6 CDR y tener un sitio de unión a antígeno que es equivalente al de una molécula de anticuerpo clásica. El resto del polipéptido puede ser cualquier secuencia que proporcione un armazón adecuado para el sitio de unión a antígeno y lo presente de una manera apropiada para que se una al antígeno. El anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina completa o una parte de la misma, tal como un Fab, F(ab)₂, Fv, un fragmento Fv monocatenario (scFv) o un nanocuerpo. El anticuerpo puede ser un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo puede estar conjugado con un polímero (por ejemplo, PEG), toxina o marcador. El anticuerpo puede ser un anticuerpo bifuncional. El anticuerpo puede ser no humano, quimérico, humanizado o completamente humano.

20 La expresión "biblioteca de anticuerpos" se refiere a una colección de anticuerpos que comprenden distintas CDR y, por lo tanto, demuestran especificidad diferencial.

Un anticuerpo típico está compuesto por dos cadenas pesadas de inmunoglobulina (Ig) y dos cadenas ligeras de Ig. Existen varios tipos distintos de cadena pesada, que definen la clase o isotipo de un anticuerpo. Hay cinco tipos de
 30 cadena pesada de inmunoglobulina de mamífero: γ , δ , α , μ y ϵ , que definen las clases de inmunoglobulinas: IgG, IgD, IgA, IgM e IgE, respectivamente. Todas las cadenas pesadas contienen una serie de dominios de Ig, habitualmente con un dominio variable (V_H) que es importante para la unión al antígeno y varios dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , etc.).

Hay dos tipos de cadena ligera en mamífero, la cadena kappa (κ), codificada por el locus kappa de Ig (IGK) en el cromosoma 2 humano y la cadena lambda (λ), codificada por el locus lambda de Ig (IGL) en el cromosoma 22 humano.
 35 Sólo un tipo de cadena ligera está presente en un anticuerpo típico, por lo tanto, las dos cadenas ligeras de un anticuerpo individual son idénticas. Cada cadena ligera está compuesta por dos dominios de Ig en tándem; un dominio constante (C_L) y un dominio variable (V_L) que es importante para la unión al antígeno.

La unión del anticuerpo al antígeno se ve facilitada por la región Fab (fragmento, unión al antígeno) en el dominio N-terminal del anticuerpo. El Fab está compuesto por un dominio constante y uno variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo. La diversidad del repertorio de anticuerpos está basada en la recombinación somática de los segmentos de los genes variables (V), diversidad (D) y de unión (J). En los seres humanos, los genes de Ig se ensamblan aleatoriamente a partir de aproximadamente 50 segmentos de genes V, 25 de D y 6 de J para las cadenas pesadas y más de 30 genes de cadenas ligeras V_k y V_λ potencialmente funcionales y 5 genes de J_k y 4 J_λ ,
 45 respectivamente.

Los bucles variables, tres en cada una en las cadenas V_L y V_H , son responsables de la unión al antígeno. Estos bucles se denominan regiones determinantes de complementariedad (las CDR). Las CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de cada una de las V_H y V_L están dispuestas de forma no consecutiva. Dentro del dominio variable, la CDR1 y la CDR2 se encuentran en la región V de la cadena polipeptídica, y la CDR3 incluye algo de la región V, toda la D (solo las cadenas pesadas) y la J. Dado que la mayoría de la variación de secuencia asociada con las inmunoglobulinas se encuentra en las CDR, estas regiones pueden denominarse regiones hipervariables. Entre estas, la CDR3 muestra la mayor variabilidad dado que está codificada por una recombinación de VJ en el caso de una región de cadena ligera y de VDJ en el caso de las regiones de cadena pesada. Las regiones entre las CDR en el dominio variable de una
 50 inmunoglobulina se conocen como regiones marco conservadas. Estas son importantes para establecer la estructura de los dominios V_H y V_L . Los dominios variables de las cadenas H (V_H) y L (V_L) constituyen una unidad Fv y pueden interactuar estrechamente para formar una unidad Fv (ScFv) monocatenaria.

El dominio C-terminal de un anticuerpo se llama la región constante. En la mayoría de las cadenas H, se encuentra una región bisagra. Esta región bisagra es flexible y permite que las regiones de unión Fab se muevan libremente con respecto al resto de la molécula. La región bisagra también es el lugar en la molécula más susceptible a la acción de las proteasas, que pueden dividir el anticuerpo en el sitio de unión al antígeno (Fab) y la región efectora (Fc).

La estructura en dominios de la molécula de anticuerpo es favorable para el diseño técnico de proteínas, facilitando el intercambio entre las moléculas de dominios funcionales que portan las actividades de unión a antígeno (los Fab y los Fv) o las funciones efectoras (las Fc). La estructura del anticuerpo también facilita la producción de anticuerpos con

capacidad de reconocimiento a un antígeno unidos a moléculas tales como toxinas, linfocitos, factores de crecimiento y agentes detectables o terapéuticos.

5 Los anticuerpos quiméricos se pueden producir trasplantando dominios variables de anticuerpos de una especie (por ejemplo, un ratón) a dominios constantes de anticuerpos de otra especie (por ejemplo, un ser humano).

10 Los fragmentos Fab, Fv y ScFv con los V_H y V_L unidos por un enlazador polipeptídico presentan especificidades y afinidades por el antígeno similares a los anticuerpos monoclonales originales. Las proteínas de fusión de ScFv se pueden producir con una molécula que no sea un anticuerpo unida al extremo amino o al carboxilo. En estas moléculas, el Fv se puede usar para el direccionamiento específico de la molécula unida a una célula que expresa el antígeno apropiado. También pueden crearse anticuerpos bifuncionales diseñando técnicamente dos especificidades de unión distintas en una única cadena de anticuerpo. Los anticuerpos Fab, Fv y ScFv bifuncionales pueden comprender dominios diseñados técnicamente tales como dominios CDR injertados o humanizados.

15 Los genes que codifican las inmunoglobulinas o moléculas similares a inmunoglobulina pueden expresarse en una diversidad de sistemas de expresión heterólogos. Las proteínas glucosiladas grandes, incluyendo las inmunoglobulinas, se secretan de forma eficaz y se ensamblan en células eucariotas, particularmente en células de mamífero. Los fragmentos pequeños, no glucosilados, tales como los fragmentos Fab, Fv o scFv, pueden producirse en forma funcional en células de mamífero o en células bacterianas.

20 El dominio de unión a antígeno puede comprender las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina, expresadas a partir de genes separados, o puede usar la cadena ligera de una inmunoglobulina y una cadena pesada truncada para formar un fragmento Fab y uno F(ab)₂. Como alternativa, se pueden usar formas truncadas de cadenas pesadas y ligeras que se ensamblan para formar un fragmento Fv. Además se puede usar un fragmento svFv diseñado técnicamente, en cuyo caso, solo se precisa un único gen para codificar el dominio de unión a antígeno.

25 El reactivo de afinidad puede ser, alternativamente, una molécula que no se obtenga o se base en una inmunoglobulina. Se han desarrollado varias proteínas de repetición diseñadas (las DRP, forma siglada de *designed repeat proteins*) "miméticas de anticuerpos" para explotar las capacidades de unión de los polipéptidos que no son anticuerpos.

30 Las proteínas de repetición, tales como la anquirina o las proteínas de repetición ricas en leucina, son moléculas de unión ubicuas que están presentes, a diferencia de los anticuerpos, de forma intra y extracelular. Su arquitectura modular singular presenta unidades estructurales repetitivas (repeticiones), que se apilan juntas para formar dominios de repetición alargados que presentan superficies de unión a la diana variables y modulares. Basándose en esta modularidad, se pueden generar bibliotecas de polipéptidos combinatorias con especificidades de unión altamente diversificadas. Las DARPin (forma siglada de *Designed Ankyrin Repeat Proteins*, proteínas de repetición diseñadas de anquirina) son un ejemplo de un mimético de anticuerpo basado en esta tecnología.

35 Para las Anticalin, la especificidad de unión se obtiene de las lipocalinas, una familia de proteínas que realizan una serie de funciones *in vivo* asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura robusta intrínseca que comprende un barril β altamente conservado que sustenta cuatro bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles para la entrada a un bolsillo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula explican la variación en la especificidad de unión entre distintas lipocalinas.

40 Los Avimer se desarrollan a partir de una familia grande de dominios de receptores extracelulares humanos mediante barajeado de exones *in vitro* y la presentación en fagos, generando proteínas multidominio con propiedades de unión e inhibidoras.

45 Versabodies son proteínas pequeñas de 3-5 kDa con > 15 % de cisteínas, que forman un armazón de alta densidad de disulfuros, reemplazando el núcleo hidrófobo presente en la mayoría de las proteínas. El reemplazo de un gran número de aminoácidos hidrófobos, que comprenden el núcleo hidrófobo, por un pequeño número de disulfuros, da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrófila, más resistente a las proteasas y al calor, y que tiene una densidad más baja de epítopos de linfocitos T. Todas estas cuatro propiedades dan como resultado una proteína que tiene una inmunogenicidad considerablemente reducida. Además, pueden fabricarse en *E. coli* y son altamente solubles y estables.

60 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

La estructura global de una proteína está proporcionada por características estructurales primarias, secundarias y terciarias.

La estructura primaria de una proteína es la secuencia lineal de sus unidades de aminoácido.

- La estructura secundaria de una proteína es la forma tridimensional general de segmentos locales de unidades de aminoácido. La estructura secundaria de las proteínas consiste en interacciones locales interrestos, que pueden estar mediadas por puentes de hidrógeno. Las estructuras secundarias más comunes son las hélices α y las láminas β . También pueden producirse otras hélices, tales como la hélice 3_{10} y la hélice π . Otras estructuras extendidas, tales como la hélice de poliprolina y la lámina α , son raras en las proteínas en el estado nativo, pero pueden representar intermediarios importantes del plegamiento de proteínas. Giros cerrados y bucles sueltos y flexibles unen los elementos de estructura secundaria más definidos. El enrollamiento aleatorio no es una estructura secundaria verdadera, pero es la clase de conformaciones que indican una ausencia de estructura secundaria regular.
- Los aminoácidos varían en su capacidad de formar los diversos elementos de estructura secundaria. La prolina y la glicina se conocen, en ocasiones, como "rompedoras de hélices" porque alteran la regularidad de la conformación del esqueleto helicoidal α ; sin embargo, ambas tienen capacidades conformacionales inusuales y se encuentran comúnmente en los giros. Los aminoácidos que prefieren adoptar en las proteínas conformaciones helicoidales incluyen la metionina, la alanina, la leucina, el glutamato y la lisina. Por el contrario, los grandes restos aromáticos, tales como el triptófano, la tirosina y la fenilalanina, y los aminoácidos ramificados en $C\beta$, tales como la isoleucina, la valina y la treonina, están presentes más comúnmente en las conformaciones de cadena β . Sin embargo, estas preferencias no son lo suficientemente fuertes como para producir un método fiable de predicción de la estructura secundaria solo a partir de la secuencia.
- Existen varios métodos conocidos en la técnica para definir la estructura secundaria de la proteína (por ejemplo, DEFINE, DSSP, STRIDE y SST).
- La estructura terciaria es la estructura tridimensional de una proteína formada por el empaquetamiento de elementos de estructura secundaria en unidades globulares compactas conocidas como dominios de proteínas. Las proteínas completas pueden comprender uno o varios de tales dominios, y la estructura terciaria puede referirse a cada dominio individual, así como a la configuración completa de la proteína completa, siempre y cuando contenga un único esqueleto de cadena polipeptídica contiguo. La estructura terciaria de una proteína está determinada principalmente por interacciones hidrófobas y la formación de enlaces disulfuro entre los restos de cisteína.
- Las proteínas que se forman por el ensamblaje de distintas cadenas polipeptídicas plegadas dan lugar a la estructura cuaternaria.
- Como se ha descrito anteriormente, la capacidad de un reactivo de afinidad, tal como un anticuerpo, de unirse a un antígeno o proteína diana está conferida principalmente por la secuencia y la estructura secundaria del sitio de unión a antígeno. Cuando el reactivo de afinidad es un anticuerpo o un fragmento, la capacidad de unirse a un antígeno o proteína diana está conferida principalmente por la secuencia y la estructura secundaria de los bucles de la CDR, principalmente la CDR3. El método de la presente divulgación implica, por lo tanto, la determinación de las estructuras peptídicas que permitan a un ligando unirse a una proteína diana, generando una biblioteca de péptidos que imitan estas características estructurales e injertando los péptidos en el sitio de unión a antígeno de los reactivos de afinidad. Por ejemplo, los péptidos pueden injertarse en una o más de las regiones CDR de los anticuerpos.
- Los métodos para determinar las características estructurales necesarias para que un ligando se una a una proteína diana son conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, cristalografía molecular, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de proteínas, espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE) o de resonancia de espín electrónico (REE), microscopía crioelectrónica.
- Una vez que se han determinado las características estructurales implicadas en la interacción ligando:proteína diana, éstas se utilizan para guiar la generación de bibliotecas de péptidos que comprenden las características estructurales necesarias. Los péptidos se injertan entonces en el sitio de unión a antígeno de los reactivos de afinidad, por ejemplo, la CDR (o las CDR) de un anticuerpo.
- En este sentido, se puede usar un algoritmo que utiliza las propiedades conocidas de los aminoácidos para generar una serie de posibles péptidos que proporcionarán las características estructurales secundarias necesarias.
- Además de los aminoácidos que proporcionan las características estructurales necesarias, pueden incorporarse en los péptidos aminoácidos adicionales para generar diversidad dentro de la biblioteca de péptidos. Se pueden utilizar aminoácidos alternativos con propiedades similares para proporcionar las características estructurales necesarias. Este uso de aminoácidos alternativos con propiedades similares introducirá una diversidad adicional en la biblioteca de péptidos.
- Los métodos para injertar péptidos en el sitio de unión a antígeno de los reactivos de afinidad son conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando se "injeta" un péptido en la región CDR de un anticuerpo, esto puede implicar insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido en la región CDR de un anticuerpo. Alternativamente, el "injerto" puede implicar reemplazar la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR endógena por una que codifica un péptido que proporciona las características estructurales necesarias.

Como se ha descrito anteriormente, la especificidad antigénica de un anticuerpo está determinada principalmente por la región CDR3. El método de la presente invención puede implicar, por lo tanto, injertar la biblioteca de péptidos en la región codificante de la CDR3 de un anticuerpo.

5 La región CDR3 puede ser V_L-CDR3 o V_H-CDR3.

PROTEÍNA DIANA

El término "proteína diana" se refiere a una entidad contra la cual se diseña una biblioteca de reactivos de afinidad.

10 El término proteína, como se usa en el presente documento, es sinónimo de péptido o polipéptido.

Estos términos se utilizan en el sentido convencional para referirse una serie de restos, normalmente L-aminoácidos, conectados entre sí, normalmente por enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes.

Una proteína diana puede ser, pero sin limitación, una quimiocina, una citoquina o un factor de crecimiento, un receptor acoplado a proteína G (GPCR) o un receptor tirosina quinasa, una integrina u otra clase de molécula de adhesión celular, una enzima tal como una quinasa, una fosfatasa, una hidrolasa, una ubiquitinasa, una proteasa, una lipasa o una carbohidrasa; una proteína diana también puede ser un anticuerpo, una proteína estructural tal como actina o miosina, una proteína de tráfico tal como clatrina o un canal iónico (activado por voltaje o activado por ligando); una proteína diana también puede ser una hormona peptídica, por ejemplo, insulina o una hormona tiroidea o un neuropéptido.

25 INTEGRINA ALFA-V/BETA 6 (AVB6)

La presente invención proporciona un método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad contra α V β 6.

30 Las integrinas son heterodímeros obligados que contienen dos cadenas distintas, denominadas subunidades α y β . Se han caracterizado dieciocho subunidades α y ocho β en mamíferos y las subunidades α y β penetran cada una en la membrana plasmática y poseen pequeños dominios citoplásmicos.

α V β 6 es un receptor para diversos ligandos, incluyendo fibronectina, tenascina y el péptido asociado a la latencia 1 y el péptido asociado a la latencia 3 (LAP1 y LAP3), la región NH₂-terminal de la forma precursora latente de TGF- β 1 y TGF- β 3. α V β 6 reconoce en sus ligandos el motivo RGD y la internalización de α V β 6 a través de endocitosis mediada por clatrina propicia la invasión de las células de carcinoma. α V β 6 se une a la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa (VFA), a las proteínas de la cápside del coxsackievirus A9 y el coxsackievirus B1, y actúa como un receptor para estos virus.

40 La expresión de α V β 6 se restringe principalmente a las células epiteliales, donde se expresa a niveles relativamente bajos en el tejido sano y aumenta de manera significativa durante el desarrollo, en la lesión, la cicatrización y en tumores epiteliales. α V β 6 es una diana selectiva de tumores que se expresa en una diversidad de células cancerosas, incluyendo cánceres epiteliales tales como el carcinoma escamoso, el carcinoma de cuello uterino, el cáncer de colon y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Se ha demostrado que propician la migración, invasión y crecimiento de células cancerosas *in vivo*. La expresión fuerte de α V β 6 se correlaciona con una mala progresión en múltiples cánceres.

50 El método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad contra α V β 6 implica generar una biblioteca de péptidos que comprenden una horquilla que contiene en su giro un motivo RGD seguido de una hélice α o una hélice 3_{10} C-terminal.

Un "motivo RGD" es un tripéptido Arg-Gly-Asp.

55 Una "hélice α " es una estructura helicoidal dextrógira, en la que cada grupo N-H del esqueleto dona un puente de hidrógeno al grupo C=O del esqueleto del aminoácido cuatro restos antes. Esta estructura secundaria en ocasiones se denomina también hélice alfa clásica de Pauling-Corey-Branson o hélice 4_{13} . Entre los tipos de estructura local en las proteínas, la hélice α es la más regular y la más predecible a partir de la secuencia, así como la más predominante.

60 Se sabe en la técnica que distintas secuencias de aminoácidos tienen distinta tendencia a formar una estructura helicoidal α . La metionina, la alanina, la leucina, la glutamina, sin carga, y la lisina, tienen todas una tendencia especialmente alta a formar hélices, mientras que la prolina y la glicina tienen poca tendencia a formar hélices. La prolina rompe o retuerce una hélice, debido a que no puede donar un puente de hidrógeno de amida (que no tiene hidrógeno de amida) y también debido a que su cadena lateral interfiere estéricamente con el esqueleto del giro anterior, esto fuerza a una torsión de aproximadamente 30° en el eje de la hélice. Sin embargo, la prolina se ve a menudo como el primer resto de una hélice, debido a su rigidez estructural. En el otro extremo, la glicina también

tiende a alterar las hélices debido a que su alta flexibilidad conformacional hace que adoptar la estructura helicoidal o relativamente restringida sea costoso desde el punto de vista entrópico.

5 La tabla 1 muestra las diferencias estimadas en energía libre, estimado en kcal/mol por resto en una configuración helicoidal alfa, con respecto a la alanina establecida arbitrariamente como cero. Los números más altos (más energías libres positivas) son menos favorecidos. Las desviaciones de estos números promedio son posibles, dependiendo de las identidades de los restos vecinos.

Tabla 1

Aminoácido	3 letras	1 letra	Tendencia helicoidal
Alanina	Ala	A	0,0
Arginina	Arg	R	0,21
Asparagina	Asn	N	0,65
Acido aspártico	Asp	D	0,69
Cisteína	Cys	C	0,68
Acido glutámico	Glu	E	0,40
Glutamina	Gln	Q	0,39
Glicina	Gly	G	1
Histidina	His	H	0,61
Isoleucina	Ile	I	0,41
Leucina	Leu	L	0,21
Lisina	Lys	K	0,26
Metionina	Met	M	0,24
Fenilalanina	Phe	F	0,54
Prolina	Pro	P	3,16
Serina	Ser	S	0,5
Treonina	Thr	T	0,66
Triptófano	Trp	W	0,49
Tirosina	Tyr	Y	0,53
Valina	Val	V	0,61

10 Una hélice de 3_{10} es una estructura helicoidal dextrógira. Cada aminoácido corresponde a un giro de 120° en la hélice (es decir, la hélice tiene tres restos por giro) y un desplazamiento de $2,0 \text{ \AA}$ ($= 0,2 \text{ nm}$) a lo largo del eje helicoidal, y tiene 10 átomos en el anillo formado al hacer el puente de hidrógeno. El grupo N-H de un aminoácido forma un puente de hidrógeno con el grupo C=O del aminoácido tres restos antes.

15 Una hélice tiene un momento dipolar total provocado por el efecto agregado de todos los dipolos individuales de los grupos carbonilo del enlace peptídico, que apuntan a lo largo del eje helicoidal. Esto puede conducir a la desestabilización de la hélice a través de efectos entrópicos. Como resultado, las hélices pueden estar protegidas en el extremo N-terminal por un aminoácido cargado de forma negativa, tal como el glutamato, para neutralizar este dipolo de la hélice. También puede estar presente una protección C-terminal con un aminoácido cargado de forma positiva, tal como la lisina. La carga positiva N-terminal se usa comúnmente para unir ligandos cargados de forma negativa tales como grupos fosfato, que son especialmente eficaces debido a que las amidas del esqueleto pueden servir como donantes de puentes de hidrógeno.

25 La hélice puede comprender un motivo de terminación N y/o C-terminal. Por ejemplo, la hélice puede comprender un motivo de terminación N-terminal Glu-Pro y/o C-terminal Leu-Gln-Glu-Lys-Gly-Ile.

SELECCIÓN DE REACTIVOS DE AFINIDAD

30 La presente invención también proporciona un método para seleccionar un reactivo de afinidad que tiene la capacidad de unirse a una proteína $\alpha\text{V}\beta 6$ de una biblioteca generada como se describe en el presente documento.

La biblioteca de reactivos de afinidad se puede expresar en un sistema procariota o eucariota.

35 Los métodos para la identificación de reactivos de afinidad que tengan la capacidad de unirse a una proteína $\alpha\text{V}\beta 6$ son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, pero sin limitación, ELISA, transferencia de Western, FACS/citometría de flujo, resonancia del plasmón superficial, ensayos de protección de proteasas y FRET.

REACTIVOS DE AFINIDAD

40

La presente divulgación también proporciona secuencias peptídicas y reactivos de afinidad que comprenden dichas secuencias peptídicas.

5 Las secuencias peptídicas que comprenden un motivo RGD seguido de una hélice α o hélice 3₁₀C-terminal se muestran en la Tabla 2. A20 FMDV, un ligando de α V β 6 conocido, también se muestra para la comparación. La longitud de las secuencias de la hélice α se puede aumentar mediante el uso de múltiples unidades de la secuencia monomérica de L a L₁₆ o a A₁₇.

10 Por ejemplo, la secuencia de la hélice α puede ser (LXXLAARZKRZFNEZL)_n o (LXXLAARZKRZFNEZLA)_n.
*en donde Z = cualquier aminoácido

La secuencia peptídica puede ser D25p: EPRGDLRTLAAREKRNFNETLARLQEKGI (SEQ ID NO: 23)

15 La secuencia peptídica puede ser D34p: QPRGDLRELAARSEAQLQEKGI (SEQ ID NO: 31).

La presente divulgación también proporciona un reactivo de afinidad que comprende un péptido seleccionado del listado anterior dentro de su sitio de unión a proteína diana. El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo que comprende un péptido seleccionado del listado anterior dentro de su región CDR.

20 El anticuerpo puede comprender la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 31 en su región CDR.

La región CDR puede ser CDR3.

25 La región CDR puede ser V_H-CDR3.

Un reactivo de afinidad de la presente divulgación puede conjugarse con, por ejemplo, una toxina, un agente detectable y/o un agente terapéutico.

30 Una "toxina" es un tóxico producido por una célula u organismo vivo. Los ejemplos de toxinas incluyen, pero sin limitación, cianotoxinas, hemotoxinas, necrotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas o micotoxinas.

35 Un "agente detectable" es cualquier entidad que permita determinar la unión del reactivo de afinidad a la proteína diana. El agente detectable puede incluir, pero sin limitación, una proteína o marcador fluorescente tal como la proteína verde fluorescente o FITC, un radiomarcador o una enzima, ejemplo, peroxidasa de rábano picante.

40 Un "agente terapéutico" es cualquier entidad que pueda ser útil para el tratamiento de la enfermedad. Los agentes terapéuticos incluyen citocinas o factores hematopoyéticos, incluyendo, pero sin limitación, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, CSF-1, M-CSF, GM-CSF, IFN α , IFN β , IFN γ , IL-10, IL-12, VEGF, proteínas morfogenéticas óseas, los FGF, TNF y TGF β .

45 Los agentes terapéuticos también incluyen agentes quimioterapéuticos. Un agente quimioterapéutico contemplado incluye, sin limitación, agentes alquilantes, nitrosoureas, etileniminas/metilmelamina, alquil sulfonatos, antimetabolitos, análogos de pirimidina, epipodofilotoxinas, enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica, tales como IFN α , IL-2, G-CSF y GM-CSF; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino, antracenedionas, urea sustituida, tal como hidroxiiurea, derivados de metilhidrazina, incluyendo N-metilhidrazina (MH) y procarbazona, supresores corticosuprarrenales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas, incluyendo antagonistas de corticoesteroides, tal como la prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y a acetato de megestro; estrógenos tales como dietilestilbestrol y equivalentes de etinilestradiol; un antiestrógeno tal como tamoxifeno; andrógenos que incluyen propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tal como flutamida, análogos de la hormona liberadora de gonadotropina y leuprolida; y antiandrógenos no esteroideos tales como flutamida.

Tabla 2

A20FM DV	NAVPNLRGDLQVLAQKVART (SEQ ID NO:3)		
RGD/hélice 3.10	RGDLXXLAAZLKZEFZENLAZ (SEQ ID NO:4)		
RGD/hélice alfa	RGDLXXLAARZKRZFNEZLAZ (SEQ ID NO:5)		
	D1	QPRGDLTSLAATLKTEFMENTLPRLQEKGI	(SEQ ID NO:6)
	D2	EPRGDLQRLAARINPVFQRDASPRLQEKGI	(SEQ ID NO:7)
	D4	QPRGDLQDLAARNKRTFNESLARLQEKGI	(SEQ ID NO:8)

	D6	QPRGDLKGLQEKG I	(SEQ ID NO:9)
	D7	EPRGDLRNLAARVKREFNENLAALQEKG I	(SEQ ID NO:10)
	D9	QPRGDLHLLAARSKPGSNEMLATLQEKG I	(SEQ ID NO:11)
	D13	QPRGDLHMLAARAKRHFNEMLATLQEKG I	(SEQ ID NO:12)
	D14	EPRGDLQMLAARLKKEFTENQLAPLQEKG I	(SEQ ID NO:13)
	D15	QPRGDLTSLAATLKTEFMENTLPRLQEKG I	(SEQ ID NO:14)
	D17	QPRGDLASLAPRKPFFNETLASLQEKG I	(SEQ ID NO:15)
	D18	EPRGDLSSLAARTKPGVQPAALATLQEKG I	(SEQ ID NO:16)
	D19	EPRGDLQILATPERTGLSTLQEKG I	(SEQ ID NO:17)
	D20	SAREPRGDLSPLAARAKREFNENLANLQEKG I	(SEQ ID NO:18)
	D21/D4	QPRGDLQDLAARNKRTFNESLARLQEKG I	(SEQ ID NO:19)
	D22	EPRGDLQRLAARINPVFQRDASPRLQEKG I	(SEQ ID NO:20)
	D23	EPRGDLQALAARTKRDFNEVLPLQEKG I	(SEQ ID NO:21)
	D24	QPRGDLDILAARIKRDFNQSLASLQEKG I	(SEQ ID NO:22)
	D25	EPRGDLRTLAAREKRNFNELARLQEKG I	(SEQ ID NO:23)
	D26	EPRGDLHSLAARTKRGFNKRLAHLQEKG I	(SEQ ID NO:24)
	D27	EPRGDLQSLASPTLQEKG I	(SEQ ID NO:25)
	D28	QPRGDLHVLASPLQEKG I	(SEQ ID NO:26)
	D29	EPRGDL SRLAARSKRDFNQELAALQEKG I	(SEQ ID NO:27)
	D30	EPRGDLHQLAARSKLQEKG I	(SEQ ID NO:28)
	D31	QPRGDLSSLAPRGKPDFNETLARLQEKG I	(SEQ ID NO:29)
	D32	EPRGDLWQLAARWKRPFSTSSLAMLQEKG I	(SEQ ID NO:30)
	D34	QPRGDLRELAARSEAQLQEKG I	(SEQ ID NO:31)
	D35	EPRGDLASLAARYKPEFNEQLAYLQEKG I	(SEQ ID NO:32)
	N38	EPRGDLQMLAARLKFFTENQLAPLQEKG I	(SEQ ID NO:33)

DIAGNÓSTICO O TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD

- 5 Puede usarse un reactivo de afinidad de la presente divulgación para el diagnóstico de una enfermedad. En el presente documento, el reactivo de afinidad se puede administrar a un sujeto que puede tener o se sospecha que tiene una enfermedad que está asociada con la expresión de la proteína diana. Preferentemente, la proteína diana no se expresa, o se expresa en menor grado, en células y tejidos no afectados.
- 10 Puede usarse un reactivo de afinidad de la presente divulgación para la prevención de una enfermedad a través del uso de una entidad profiláctica. En el presente documento, el reactivo de afinidad se puede administrar a un sujeto que aún no ha contraído la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad, para prevenir o afectar a la causa de la enfermedad o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado. con la enfermedad.
- 15 Puede usarse un reactivo de afinidad de la presente divulgación para el tratamiento de una enfermedad a través del uso de una entidad terapéutica. En el presente documento, el reactivo de afinidad se puede administrar a un sujeto que tenga una enfermedad o afección existente para disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para frenar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.
- 20 La invención se describirá a continuación adicionalmente por medio de ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto habitual en la materia a poner en práctica la invención y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1- Diseño de la biblioteca

5 Se introdujo una selectividad estructural en una biblioteca de presentación en fagos mediante la codificación genética del motivo de reconocimiento (horquilla de RGD-hélice) tridimensional (3D) del ligando $\alpha\text{V}\beta 6$ en el bolsillo de unión del anticuerpo en la VH-CDR3. La Figura 1a muestra la identidad de la secuencia de aminoácidos y la estructura media en solución por RMN de A20FMDV2, un péptido de 20 meros (N₁A₂V₃P₄N₅L₆R₇G₈D₉L₁₀Q₁₁V₁₂L₁₃A₁₄Q₁₅K₁₆V₁₇A₁₈R₁₉T₂₀), procedente de la proteína de la cubierta VP1 del virus de la fiebre aftosa y que se sabe que es un ligando altamente específico y potente para $\alpha\text{V}\beta 6$. El péptido incluye el motivo RGD_{LXXL} identificado previamente como el motivo mínimo que mantenía la especificidad para $\alpha\text{V}\beta 6$. La estructura tridimensional de A20FMDV2 se determinó por RMN y comprende una estructura de horquilla con el RGD en la punta del giro seguido de una hélice C-terminal. El análisis por RMN de diferencia de transferencia de saturación de A20FMDV2 cuando está unido a $\alpha\text{V}\beta 6$ mostró que, de nuevo, A20FMDV2 formaba una estructura de RGD-hélice con los restos R₇, L₁₀, L₁₃ y K₁₆ unidos estrechamente a $\alpha\text{V}\beta 6$, consistente con una estructura de hélice 3₁₀ y, recientemente, se ha demostrado que tales péptidos con motivos de RGD-hélice presentan características de movimiento que podrían influir en la especificidad.

20 A partir de estos datos, más los datos de RMS-DTS (Hazelbag, S. *et al.* The Journal of pathology; 212, 316-324 (2007)), se diseñaron dos algoritmos para desarrollar bibliotecas de VH-CDR3 que codifican una horquilla que contiene en su giro, un motivo RGD, seguido de una hélice α C-terminal (Fig 1b) o una hélice 3₁₀ (Fig1c); también se muestra para cada biblioteca el mapa en rueda helicoidal. La VH-CDR3 de molde sintética se basó en la secuencia de hélice α donante L₈A₉R₁₀L₁₁K₁₂R₁₃E₁₄F₁₅N₁₆E₁₇, que es la hélice 1 del homeodominio arraigado de Drosophila (EN-HD). Sin embargo, en la biblioteca, el L₈ se cambió a A₈ para evitar la formación de un motivo LXXLL. La VH-CDR3 molde incluye:

E₁P₂R₃G₄D₅L₆X₇X₈L₉A₁₀A₁₁R₁₂Z₁₃K₁₄R₁₅Z₁₆F₁₇N₁₈E₁₉Z₂₀L₂₁A₂₂Z₂₃L₂₄Q₂₅E₂₆K₂₇G₂₈

30 Z y X eran restos aleatorios de aminoácidos introducidos en el mismo cuadrante que los restos de Leu del motivo RGD_{LXXL}: en la posición 13, 16, 20 y 23 en la hélice α basada en la rueda helicoidal (3,6 restos por vuelta de la hélice). Los motivos EP y LQEKGI eran regiones de terminación de la hélice N- y C-terminales, respectivamente (basándose en el C-cap patrón de Schellmann: Leu-Gln-Glu-Lys-Gly-Ile (LQEKGI) (Figura 1b). Para extender más la longitud de la hélice, la secuencia donante EN-HD se repitió a partir de las posiciones 21/22 en la biblioteca.

35 Para construir la biblioteca de la hélice 3₁₀ se utilizó el molde E₁P₂R₃G₄D₅L₆X₇X₈L₉A₁₀A₁₁Z₁₂L₁₃K₁₄Z₁₅E₁₆F₁₇Z₁₈E₁₉N₂₀Z₂₁L₂₂A₂₃Z₂₄L₂₅Q₂₆E₂₇K₂₈G₂₉I₃₀, insertando un resto de aminoácido aleatorio en cada tercera posición siguiendo el motivo RGD_{LXXL} en la hélice 3₁₀ (3,0 restos por vuelta de hélice 3₁₀, Fig.1c). Por tanto, los restos aleatorios proporcionaron automáticamente hélices de distintas longitudes debido a que incluían restos estabilizadores de la hélice, tal como alanina, lisina o arginina, o, como alternativa, restos destructores de la hélice, tales como la prolina, así como incluye restos que abarcan todas las propiedades de la cadena lateral para probar el efecto de la carga, la hidrofobicidad y las interacciones estéricas.

Ejemplo 2 - Selección de bibliotecas y exploración de candidatos principales

45 Después de 3 ciclos de cribado alterno sobre $\alpha\text{V}\beta 6$ recombinante inmovilizada y células que expresan $\alpha\text{V}\beta 6$, fue evidente que la biblioteca de hélice α se desempeñó mejor, con ~ 80 % de los clones explorados uniéndose a $\alpha\text{V}\beta 6$ recombinante en ELISA, mientras que en la biblioteca de hélice 3₁₀ se observó solo ~ 15 % de ligantes (Figura 2a). La secuenciación automatizada de 124 ligantes fuertes reveló 41 secuencias singulares de VH-CDR3 que codifican en su mayoría una hélice α , lo que demuestra que la hélice α es la estructura preferente para la interacción con $\alpha\text{V}\beta 6$. Ninguna de las secuencias de V_H-CDR3 coincidió con ninguna proteína humana conocida y, por lo tanto, representaron secuencias totalmente singulares. Se analizaron 33 clones de scFv singulares mediante citometría de flujo en líneas celulares que expresan $\alpha\text{V}\beta 6$ y negativas $\alpha\text{V}\beta 6$ (Figura 2b). Ninguno de los scFv se unió a las células negativas para $\alpha\text{V}\beta 6$ y muchos scFv se unieron bien a las células que expresan $\alpha\text{V}\beta 6$. Dado que A375puro expresa de forma endógena las integrinas dirigidas a RGD $\alpha 5\beta 1$, $\alpha\text{V}\beta 3$, $\alpha\text{V}\beta 5$ y $\alpha\text{V}\beta 8$, estos datos sugieren fuertemente que los scFv presentaron una unión específica de $\alpha\text{V}\beta 6$. Basándose en los rendimientos de expresión, la estabilidad bioquímica (SDS-PAGE) y la fuerza de unión a $\alpha\text{V}\beta 6$ celular (citometría de flujo); Figura 2b) los estudios adicionales se basaron en 2 scFv distintos procedentes de la biblioteca de hélice α : D25scFv (D25) y D34scFv (D34) (Figura 2b).

60 El perfil de la cromatografía de exclusión por tamaño del scFv D25 purificado mostró un pico principal que eluía a 70 ml, correspondiente al scFv de 30 kDa. Para D25 también se observaron picos más bajos que eluían a 45-60 ml, correspondientes a los dímeros y tetrameros del scFv. (Figura 2c). Además, se observaron los péptidos VH-CDR3 correspondientes (D25p y D34p, respectivamente), que presentaron una unión a las células específica de $\alpha\text{V}\beta 6$ (Figura 3a).

65

Ejemplo 3 - Eficacia antagonista específica de $\alpha V\beta 6$

5 D25scFv, D34scFv, D25p y D34p mostraron una inhibición dependiente de la dosis de la unión a $\alpha V\beta 6$ celular del péptido A20FMDV2 (NAVPNLRGDLQVLQAKVART), que se une con alta afinidad (K_D 1,7 nM) y especificidad a la integrina $\alpha V\beta 6$ (Fig.3b-c). Adicionalmente, D25scFv, D25p, D34scFv y D34p presentaron una inhibición significativa dependiente de la concentración de la adhesión de células de carcinoma dependiente de $\alpha V\beta 6$ a fibronectina inmovilizada (Figura 3d y 3e).

Ejemplo 4 - Internalización específica de $\alpha V\beta 6$

10 D25scFv y D34scFv presentaron una internalización celular en células que expresan $\alpha V\beta 6$ pero no en células negativas para $\alpha V\beta 6$. A los 0 minutos, los scFv se localizaron en la superficie celular (Fig. 4a, d para D25 y D34, respectivamente), pero después de la incubación a 37 °C durante 45 minutos, se localizaron dentro del citoplasma celular y el núcleo (Fig. 4.b, e para D25 y D34, respectivamente). La omisión de la capa primaria de scFv y el marcaje solo con anti-myc y el anticuerpo secundario marcado con fluorocromo mostraron muy poca tinción nuclear, sugiriendo que la localización nuclear de los scFv era real (Fig. 4c, f) para D25 y D34, respectivamente). De forma similar, D25p biotinilado y D34p biotinilado también experimentaron internalización celular en células que expresan $\alpha V\beta 6$ (Fig. 4h y k para D25p y D34p, respectivamente), pero no en células negativas para $\alpha V\beta 6$ (Fig. 4i, y l para D25p y D34p, respectivamente). Se observó internalización eficaz a los 30-45 minutos (Fig. 4 h, k para D25p y D34p, respectivamente) pero no se observó localización nuclear.

Ejemplo 5 - El péptido D25 biotinilado localiza tumores que expresan $\alpha V\beta 6$ *in vivo*

25 Cuando se inyectaron por vía intravenosa 12,5 MBq de [^{111}In] -DTPA-estreptavidina asociada con D25p biotinilado en tres ratones portadores de un tumor A375P $\beta 6$ positivo para $\alpha V\beta 6$ positivo y un tumor A375Ppuro negativo para $\alpha V\beta 6$, en los hombros opuestos, se observó un 32 % de captación de dosis inyectada en el tumor positivo para $\alpha V\beta 6$ en comparación con solo el 3 % para el tumor negativo para $\alpha V\beta 6$, 1 hora después de la inyección, una proporción de >10:1 (Figura 5). Esto se tradujo en una discriminación muy clara del tumor para $\alpha V\beta 6$ por tomografía de emisión monofotónica (SPECT, forma siglada de *single-photon emission computed tomography*) (Figura 5).

Ejemplo 6 - Determinación estructural de los péptidos D25 y D34 por RMN

35 Se usó RMN para resolver las estructuras en solución de los péptidos D34p y D25p. La Figura 6 muestra el modelo de transformación a 3D más cercano a la media calculada para cada péptido a partir de un conjunto de 20 estructuras de RMN; los datos estadísticos estructurales asociados procedentes del CNS para ambos péptidos están disponibles en la Tabla 4 y el NOE y la información de contacto estructural están disponibles en las Figuras 8 y 9. Ambos péptidos presentaban el motivo de horquilla RGD-hélice. D34, que tiene 22 aminoácidos, tiene una hélice más corta que el péptido D25, que tiene 29 aminoácidos. Las hélices para ambos péptidos se definieron como una hélice α convencional con la hélice α de D34 extendiéndose desde Leu6-Leu17 y la hélice α de D25 extendiéndose desde Leu6-Gln25.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para construir la biblioteca guiada estructural

I.D del cebador	Secuencia (5' a 3')
Cebador 1 (LMB3)	
Cebador 2/ hélice α	CCAGATCCCTTTCTCCTGCAAMNNGGCTAGMNNCTCGTTGAAMNCCGCTTMNNTCG GGCTGGGAGMNNMNNNTAGGTCTCCTCGAGGTTCTCTTGACACAGTAATACACGGCCGT GTC
Cebador 2/hélice 310	CCAGATCCCTTTCTCCTGCAAMNNGGCGAGMNNGTCTCMNNGAACTCMNNTTCAG MNNGGCTGCGAGMNNMNNNTAGGTCTCCTCGAGGTTCTCTTGACACAGTAATACACGGC CGTGTC
Cebador 3	GCCTGAACCGCCCTCCACCACTCGAGACGGTGACCAGGGTACCTTGGCC- CCAGATCCCTTTCTCCTGCAA
Fdseq	GAATTTTCTGTATGAGG
LMB3	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabla 4. RMN y estadística de perfeccionamiento para conjuntos de 20 estructuras de péptidos

	D34p	D25p
Distancia y restricciones de diedro por RMN		
Restricciones de distancia		
NOE total	319	624
Intrarresto	115	233
Interresto	204	391
Secuencial ($ i-j = 1$)	123	200
Intervalo medio ($ i-j < 4$)	79	189
Intervalo largo ($ i-j < 5$)	2	2
Puentes de hidrógeno	7	15
Restricciones de diedro	22	40
Energía de Lennard-Jones (kJ mol ⁻¹)	-890,97	-1608,67
Estadística estructural		
Violaciones		
Violaciones del NOE >0,2 Å	0 ± 0,002	0 ± 0,007
Violaciones del ángulo diedro >2,0°	0 ± 0,008	0 ± 0,007
Ramachandran (%) [†]		
Regiones más favorecidas	85,0	88,1
Regiones permitidas adicionalmente	10,9	10,2
Regiones permitidas generosamente	3,5	1,0
Regiones no permitidas	0,6	0,6
Desviación cuadrática media por pares promedio* (Å) A lo largo de los restos 6-17 A lo largo de los restos 6-25		
Pesado	1,346	1,431
Esqueleto	0,540	0,649

* Para todas las estructuras aceptadas del cálculo de 40 estructuras

† Para 20 estructuras con agua minimizada de menor energía

Métodos

5 Construcción de la biblioteca y selección

La construcción de la biblioteca se muestra en la Figura 1. Se utilizó como molde de PCR un conjunto de 50 genes de VH humanos clonados en el vector pHEN1. La biblioteca se amplificó inicialmente con el cebador LMB3 (Tabla 3), que hibrida con las secuencias del vector pHE N1 5' con respecto al gen de VH clonado y el cebador 1, que hibrida con al extremo 3' del gen VH, que estaba compuesto de la región marco conservada 3 (FR3), los motivos estructuralmente guiados codificados por los algoritmos de hélice α o 3_{10} y finalmente las secuencias de JH4 (Tabla 3). En una segunda etapa de PCR, El sitio de restricción XhoI se introdujo 3' con respecto a la secuencia de JH4 después de la amplificación con el cebador 2 y LMB3. Los amplicones del gen de VH que contenían los insertos que codifican los algoritmos se digirieron después con las enzimas de restricción XhoI y NcoI, y se insertaron en el vector pIT2 tratado con NcoI y XhoI que contiene el repertorio de VL.

Las bibliotecas de hélice α y 3_{10} se rescataron cada una por separado utilizando el fago auxiliar M13-KO7. Para la selección, los inventores usaron en paralelo cada biblioteca por separado, así como las bibliotecas de hélice α y 3_{10} mezcladas. La selección de fagos inicial se realizó utilizando proteína $\alpha\beta6$ recombinante inmovilizada. Después de dos ciclos de selección sobre $\alpha\beta6$ inmovilizada, las bibliotecas se seleccionaron en $\alpha\beta6$ expresada en células utilizando las líneas celulares A375P $\beta6$ y A375PPuro, para la selección positiva para $\alpha\beta6$ y negativa para $\alpha\beta6$, respectivamente. La exploración de elección se realizó utilizando ELISA con de $\alpha\beta6$ recombinante inmovilizada 5 $\mu\text{g/ml}$ como se describe.

25 Líneas celulares

Las líneas celulares adherentes de melanoma A375P $\beta6$ y A375Ppuro se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternera fetal (STF) al 10 %. El carcinoma de células escamosas oral humano VB6, que se modificó técnicamente para expresar altos niveles de $\alpha\beta6$, se cultivó en medio de cultivo de queratinocitos.

Exploración de la especificidad por integrinas mediante citometría de flujo

El scFv purificado se analizó en cuanto a la especificidad para $\alpha\beta6$ por citometría de flujo utilizando las parejas isogénicas de líneas celulares, A375P $\beta6$ y A375Ppuro, que expresan niveles similares de cuatro integrinas de unión a RGD ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta8$, $\alpha5\beta1$), pero solo A375P $\beta6$ expresa $\alpha\beta6$. En resumen, se desprendieron las células con tripsina/EDTA, se lavaron dos veces en tampón de lavado enfriado en hielo (BSA al 0,1 %/DMEM/NaN₃ al 0.1 %) y se resuspendieron 2 x10⁵ células en 50 μl de tampón de lavado por muestra. Entre las etapas de incubación, todas las muestras se lavaron dos veces con tampón de lavado, a menos que se indique otra cosa. Las células se incubaron en hielo durante 1 h con 0,1 o 1 μM de péptido scFv purificado, se lavaron dos veces. Para scFv, las células se incubaron

después durante 1 h en hielo con anticuerpo anti-Myc de ratón (clon 9E10, Santa Cruz) a 1:100. Después del lavado, el anticuerpo unido se detectó con anti-IgG de ratón-Alexafluor 488 (1:250 durante 1 h; Molecular Probes), en hielo. El péptido procedente de VH-CDR3 unido se detectó mediante IgG antibiotina de conejo (1:200), seguido de anti-IgG de conejo-Alexafluor 488 (1:250; Molecular Probes). Las células se analizaron utilizando el FACSCalibur (Beckton Dickinson). La expresión celular de la integrina $\alpha V\beta 6$ se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón (clon 10D5, 10 $\mu\text{g/ml}$; Millipore) y la unión no específica (control) con IgG no coincidente con la clase inmunitaria.

Inhibición de la unión al ligando de $\alpha V\beta 6$

La propensión de los candidatos principales de scFv a inhibir la unión del A20FMDV2 biotinilado específico para $\alpha V\beta 6$ a células que expresan $\alpha V\beta 6$, se determinó mediante preincubación con scFv purificado o con péptido (0,1 y 1,0 μM) durante 10 minutos, seguido inmediatamente de 40 minutos de incubación con el A20FMDV2 biotinilado (10 nM). Los péptidos A20FMDV2 unidos se detectaron mediante IgG anti-biotina de conejo (1:200), seguido de anti-IgG de conejo-Alexafluor 488 (1:250; Molecular Probes).

Cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC)

La estabilidad estructural de las proteínas scFv se evaluó mediante cromatografía de filtración en gel utilizando sephacryl S-200 HiPrep 16/60 (GE healthcare, Amersham, RU) conectado a una AKTA FPLC (GE healthcare, Amersham, RU). Los fraccionamientos se realizaron en PBS a un caudal de 0,3 ml/min con detección a 280 nm. Un kit de calibración (GE healthcare, Amersham, Reino Unido) que contiene marcadores de proteínas (aprotinina, ribonucleasa A, anhidrasa carbónica, ovoalbúmina y conalbúmina), se utilizó para generar una curva de calibración. Se prepararon cantidades iguales de cada uno de los marcadores de proteínas hasta 500 μl en PBS antes de la carga en la columna. Los valores de K_{av} obtenidos de la ecuación: $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_c - V_0)$; donde V_e = volumen de elución, V_c = volumen geométrico de la columna y V_0 = volumen de vacía de la columna, se representaron frente al log del peso molecular para generar una curva de calibración de proteínas. Se cargó scFv purificado (50 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$) en la columna de filtración en gel y se determinó el peso molecular de los distintos picos usando la curva de calibración.

Ensayo de internalización

Se sembraron 2×10^4 células (DX3puro, DX3 $\beta 6$ o VB6) sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de cultivo de 24 pocillos y se dejaron incubar durante una noche a 37 °C en medio de crecimiento. Las células se lavaron dos veces en medio sin suero (MSS) y después se añadió scFv (4 μM) o péptido de CDR3 biotinilado (100 nM) diluidos en MSS, en hielo durante 10 minutos. Después de dos lavados enfriados en hielo y de 10 minutos adicionales en hielo con anticuerpo anti-biotina de ratón (10 $\mu\text{g/ml}$), se añadió a las células medio precalentado que contenía SFT al 10 %, y se incubó a 37 °C. A intervalos de 10 minutos entre 0-60 minutos, las células se fijaron en HCHO al 2 % en PBS y se permeabilizaron con TritonX-100 al 0,1 % (PBS) durante 3 minutos. El scFv se detectó con ratón anti c-myc (dilución 1:100, clon 9E10; 30 min, temperatura ambiente) y seguido de la detección del péptido mediante IgG antibiotina de conejo (1:200). Tanto el péptido como el scFv se detectaron con anti-ratón Alexa488 durante 30'. Los núcleos fueron contramarcados con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), los cubreobjetos se montaron con Mowiol y las muestras se examinaron por microscopía confocal (Zeiss LSM510, Welwyn Garden City).

Ensayo de adherencia con picogreen

Todos los ensayos de adhesión se realizaron por cuadruplicado y se repitieron al menos 2-3 veces. En un formato de placa de 96 pocillos, los pocillos de prueba se recubrieron con Fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}/\text{PBS}$) y los pocillos de control negativo se recubrieron con BSA al 0,1 % (seroalbúmina bovina)/PBS. Después de la incubación a 37 °C durante 1 hora, las placas se lavaron en PBS tres veces y se bloquearon con BSA al 0,1 %/PBS durante 30 minutos a 37 °C. Después de un aclarado con PBS, las células se sembraron en los pocillos, la placa se dejó reposar en hielo para evitar la deshidratación y para garantizar una temperatura inicial uniforme para el experimento. Se añadió scFv o péptido purificado (25 μl) a los pocillos en las concentraciones deseadas, antes de añadir $1,5 \times 10^4$ células (25 μl) por pocillo. En algunos experimentos, las células ($1,5 \times 10^4$) se pretrataron con anticuerpo de bloqueo de $\beta 1$ A11B2 a 10 $\mu\text{g/ml}$ antes de la siembra en los pocillos de prueba. Para determinar el porcentaje de adhesión, las curvas patrón se generaron sembrando en placas de 0 - $2,5 \times 10^4$ células en pocillos separados. Después de incubar las placas a 37 °C durante 30', las placas se lavaron dos veces en CaCl_2 1 mM/ MgCl_2 0,5 mM/PBS y se transfirieron a -80 °C durante 15 minutos. Las células adherentes se cuantificaron utilizando el kit Picogreen (Invitrogen) y se analizaron en un lector de fluorescencia (FLUOstar Optima, BMG Labtech Ltd, Bucks, RU).

Localización in vivo

El péptido biotinilado se radiomarcó con Indio-111. A 10 μg de DOTA-Biotina (Macrocyclics.com n.º C-100) tamponado en acetato de amonio 1 M (pH 5,5) se le añadió acetato de indio [^{111}In]. La mezcla se calentó a 80 °C durante 30 min y se enfrió a TA durante 10 min. La DOTA-Biotina marcada se añadió a estreptavidina en una relación molar de 1:1 (1 mg de estreptavidina por 17,6 g de DOTA-Biotina). A esta mezcla, se añadieron 88 μg de D25p biotinilado y se analizaron 10 μl de la mezcla por HPLC de exclusión por tamaño para verificar la estabilidad de los productos

radiomarcados pre y posmarcaje. Se usaron un total de 50 MBq para marcar 25 ug de péptido; la muestra se dividió en cuatro de forma que cada ratón recibió 12,5 MBq (6,25 ug) de péptido D25 marcado con ^{111}In .

5 Se inyectaron por vía subcutánea ratones hembra atímicos desnudos con 100 μl (2×10^6 células) de A373P β 6 en el hombro derecho y A375puro en el hombro izquierdo. Se dejó que los tumores se desarrollaran durante 20 días y se administraron por vía intravenosa 200 μl de péptido D25 marcado con ^{111}In recién radiomarcado. Se obtuvieron imágenes de los tumores mediante NanoSPECT/CT (Bioscan, Inc.) a los puntos de tiempo de 1 hora, 4 horas y 24 horas de la siguiente manera: Los ratones se colocaron en la plataforma de obtención de imágenes y se obtuvieron TC iniciales de baja resolución a 45 KVp, 180 proyecciones por rotación, 500 ms por proyección. Posteriormente, se adquirieron imágenes SPECT (tiempo de adquisición de 45 minutos) y se reconstruyeron los datos utilizando el programa informático HiSPECT-NG incorporado (Bioscan). Para medir la radioactividad asociada con los tumores, se calibró la máquina NanoSPECT/CT (antes del experimento) mediante la obtención de imágenes de un simulador con una solución patrón de indio-111. Posteriormente, se utilizó el programa informático Invivoscope (Invivo) para generar regiones tridimensionales de interés (ROI, forma siglada de *regions of interest*) alrededor de los tumores y las ROI se convirtieron a megabequerelios.

Determinación estructural por estudio de RMN

20 Se resolvieron como anteriormente las estructuras por RMN en solución de los péptidos D25 y D34 en TFE al 0,1 %. Todos los datos de RMN para los péptidos A22 (D25p) y A29 (D34p) se obtuvieron a 283 K de un espectrómetro de RMN Bruker Avance III de 14,1 T (600 MHz ^1H) equipado con una criosonda QCI-F de 5 mm. Todas las muestras de RMN eran 350 μl dentro de un tubo de RMN Shigemi y contenían péptido 1 mM en tampón de fosfato de sodio 25 mM a pH 6,5 que también contenía cloruro de sodio 50 mM, dimetilsulfóxido (DMSO) al 4 % (v/v) y trifluoroetanol- d_3 (TFE) al 30 % (v/v). El procesamiento de los datos de RMN se completó utilizando TopSpin 3.1 (Bruker), las asignaciones se completaron utilizando CCPN Analysis.

30 Los desplazamientos químicos de ^1H y las asignaciones estructurales a través del espacio se obtuvieron a partir de experimentos de NMR bidimensionales TOCSY y NOESY con tiempos de mezcla de 20 ms/60 ms para TOCSY y de 250 ms para NOESY. Los contactos NOE observados apoyan la presencia de una conformación helicoidal α a lo largo de la longitud del péptido con los NOE observados entre $\text{H}\alpha$ y HN ($i-i + 3$) así como $\text{H}\alpha$ y $\text{H}\beta$ ($i-i+3$). Los conjuntos estructurales se calcularon utilizando CNS e incluyendo los ángulos diedro confirmados por análisis DANGLE y las parejas aceptor donante de puentes de hidrógeno predichas. Al conjunto final se le minimizó el agua utilizando el programa informático YASARA Structure y se completó el análisis de Ramachandran de cada conjunto de péptidos utilizando PROCHECK-NMR.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Queen Mary University of London

40 <120> Método

<130> P102078PCT

<150> GB 1311031.7

45 <151> 20-06-2013

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

50 <210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Secuencia de la hélice alfa C-terminal

<220>

60 <221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

65 <221> misc_feature

<222> (13)..(13)

ES 2 710 535 T3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 1

 Glu Pro Arg Gly Asp Leu Xaa Xaa Leu Ala Ala Arg Xaa Lys Arg Xaa
 1 5 10 15

 Phe Asn Glu Xaa Leu Ala Xaa Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25

 <210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> secuencia de hélice 3(10)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 50 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 55 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 2
 60

ES 2 710 535 T3

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Xaa Xaa Leu Ala Ala Xaa Leu Lys Xaa Glu
 1 5 10 15

Phe Xaa Glu Asn Xaa Leu Ala Xaa Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25 30

- 5 <210> 3
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia del ligando A20 FMDV
- <400> 3

Asn Ala Val Pro Asn Leu Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys
 1 5 10 15

Val Ala Arg Thr
 20

- 15 <210> 4
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice 3(10) C-terminal
- <220>
- 25 <221> misc_feature
- <222> (5)..(6)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 30 <221> misc_feature
- <222> (10)..(10)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 35 <221> misc_feature
- <222> (13)..(13)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 40 <221> misc_feature
- <222> (16)..(16)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 45 <221> misc_feature
- <222> (19)..(19)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>
- 50 <221> misc_feature
- <222> (22)..(22)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 4

ES 2 710 535 T3

Arg Gly Asp Leu Xaa Xaa Leu Ala Ala Xaa Leu Lys Xaa Glu Phe Xaa
1 5 10 15

Glu Asn Xaa Leu Ala Xaa
20

- 5 <210> 5
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una alfa hélice C-terminal

- 15 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (5)..(6)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- 20 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (11)..(11)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- 25 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (14)..(14)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- 30 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (18)..(18)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- 35 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (21)..(21)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <400> 5

Arg Gly Asp Leu Xaa Xaa Leu Ala Ala Arg Xaa Lys Arg Xaa Phe Asn
1 5 10 15

Glu Xaa Leu Ala Xaa
20

- 40 <210> 6
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 45 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

- <400> 6

ES 2 710 535 T3

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Thr Ser Leu Ala Ala Thr Leu Lys Thr Glu
 1 5 10 15

Phe Met Glu Asn Thr Leu Pro Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25 30

- 5 <210> 7
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- <400> 7

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gln Arg Leu Ala Ala Arg Ile Asn Pro Val

1 5 10 15

Phe Gln Arg Asp Ala Ser Pro Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25 30

- 15 <210> 8
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- <400> 8

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Gln Asp Leu Ala Ala Arg Asn Lys Arg Thr
 1 5 10 15

Phe Asn Glu Ser Leu Ala Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25

- 25 <210> 9
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- 35 <400> 9

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Lys Gly Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 1 5 10

- 40 <210> 10
- <211> 29
- <212> PRT

ES 2 710 535 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

5

<400> 10

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Arg Asn Leu Ala Ala Arg Val Lys Arg Glu
1 5 10 15

Phe Asn Glu Asn Leu Ala Ala Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

10

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

<400> 11

Gln Pro Arg Gly Asp Leu His Leu Leu Ala Ala Arg Ser Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ser Asn Glu Met Leu Ala Thr Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

20

<210> 12

<211> 29

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

30

<400> 12

Gln Pro Arg Gly Asp Leu His Met Leu Ala Ala Arg Ala Lys Arg His
1 5 10 15

Phe Asn Glu Met Leu Ala Thr Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

35

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

<400> 13

ES 2 710 535 T3

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gln Met Leu Ala Ala Arg Leu Lys Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Thr Glu Asn Gln Leu Ala Pro Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25 30

- <210> 14
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- <400> 14

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Thr Ser Leu Ala Ala Thr Leu Lys Thr Glu
 1 5 10 15

Phe Met Glu Asn Thr Leu Pro Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25 30

- <210> 15
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- <400> 15

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Ala Ser Leu Ala Pro Arg Pro Lys Pro Phe
 1 5 10 15

Phe Asn Glu Thr Leu Ala Ser Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25

- <210> 16
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- <400> 16

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ala Arg Thr Lys Pro Gly
 1 5 10 15

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

- <210> 17

ES 2 710 535 T3

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

5 <220>
<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
<400> 17

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gln Ile Leu Ala Thr Pro Glu Arg Thr Gly
1 5 10 15

Leu Ser Thr Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

10
15 <210> 18
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
20 <400> 18

Ser Ala Arg Glu Pro Arg Gly Asp Leu Ser Pro Leu Ala Ala Arg Ala
1 5 10 15

Lys Arg Glu Phe Asn Glu Asn Leu Ala Asn Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25 30

25 <210> 19
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
<400> 19

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Gln Asp Leu Ala Ala Arg Asn Lys Arg Thr
1 5 10 15

Phe Asn Glu Ser Leu Ala Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

35 <210> 20
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
45 <400> 20

ES 2 710 535 T3

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

Phe Gln Arg Asp Ala Ser Pro Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25 30

- 5 <210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
<400> 21

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gln Ala Leu Ala Ala Arg Thr Lys Arg Asp
1 5 10 15

Phe Asn Glu Val Leu Pro Pro Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

- 15 <210> 22
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
<400> 22

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Asp Ile Leu Ala Ala Arg Ile Lys Arg Asp
1 5 10 15

Phe Asn Gln Ser Leu Ala Ser Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

- 25 <210> 23
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- 35 <400> 23

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Arg Thr Leu Ala Ala Arg Glu Lys Arg Asn
1 5 10 15

Phe Asn Glu Thr Leu Ala Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

- 40 <210> 24
<211> 30
<212> PRT

ES 2 710 535 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

5

<400> 24

Glu Pro Arg Gly Asp Leu His Ser Leu Ala Ala Arg Thr Lys Arg Gly
1 5 10 15

Phe Asn Glu Lys Arg Leu Ala His Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25 30

10

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

<400> 25

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gln Ser Leu Ala Ser Pro Thr Leu Gln Glu
1 5 10 15

20

Lys Gly Ile

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

30

<400> 26

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

Lys Gly Ile

35

<210> 27

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

<400> 27

ES 2 710 535 T3

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Ser Arg Leu Ala Ala Arg Ser Lys Arg Asp
 1 5 10 15

Phe Asn Gln Glu Leu Ala Ala Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25

- 5 <210> 28
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- <400> 28

Glu Pro Arg Gly Asp Leu His Gln Leu Ala Ala Arg Ser Lys Leu Gln
 1 5 10 15

Glu Lys Gly Ile
 20

- 15 <210> 29
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- <400> 29

Gln Pro Arg Gly Asp Leu Ser Ser Leu Ala Pro Arg Gly Lys Pro Asp
 1 5 10 15

Phe Asn Glu Thr Leu Ala Arg Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25

- 25 <210> 30
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal
- 35 <400> 30

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Trp Gln Leu Ala Ala Arg Trp Lys Arg Pro
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Met Leu Gln Glu Lys Gly Ile
 20 25

- 40 <210> 31
- <211> 22

ES 2 710 535 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

<400> 31

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

Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20

10

<210> 32

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

<400> 32

20

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Ala Ser Leu Ala Ala Arg Tyr Lys Pro Glu
1 5 10 15

Phe Asn Glu Gln Leu Ala Tyr Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25

25

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia peptídica que comprende un motivo RGD seguido de una hélice alfa o hélice 3 (10) C-terminal

30

<400> 33

Glu Pro Arg Gly Asp Leu Gln Met Leu Ala Ala Arg Leu Lys Lys Glu
1 5 10 15

Phe Thr Glu Asn Gln Leu Ala Pro Leu Gln Glu Lys Gly Ile
20 25 30

35

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Motivo de terminación C-terminal

<400> 34

Leu Gln Glu Lys Gly Ile
1 5

45

ES 2 710 535 T3

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia de alfa hélice
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 35
 30
 Leu Xaa Xaa Leu Ala Ala Arg Xaa Lys Arg Xaa Phe Asn Glu Xaa Leu
 1 5 10 15
 <210> 36
 <211> 17
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de alfa hélice
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 710 535 T3

<400> 36

Leu Xaa Xaa Leu Ala Ala Arg Xaa Lys Arg Xaa Phe Asn Glu Xaa Leu
1 5 10 15

Ala

5 <210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Motivo peptídico

<220>

15 <221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <400> 37

Arg Gly Asp Leu Xaa Xaa Leu
1 5

25 <210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia donante de hélice alfa

<400> 38

Leu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Phe Asn Glu
1 5 10

35 <210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Motivo de secuencia

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 39

50 Leu Xaa Xaa Leu Leu
1 5

<210> 40
<211> 117
<212> ADN

ES 2 710 535 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 2/alpha-helix
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(45)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (53)..(54)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(69)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (71)..(72)
 <223> n es a, c, g o t
 35
 <400> 40

 ccagatccct ttctcctgca amnnggctag mnnctcgttg aamnnccgct tmnntcgggc 60
 tgcgagmnm nntaggtctc ctcgaggttc tcttgacacag taatacacgg ccgtgtc 117

 40 <210> 41
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador 2/310-helix

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g o t

 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g o t

 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (41)..(42)
 <223> n es a, c, g o t

ES 2 710 535 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(51)
 <223> n es a, c, g o t
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(60)
 <223> n es a, c, g o t
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (71)..(72)
 <223> n es a, c, g o t
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (74)..(75)
 <223> n es a, c, g o t
 20

<400> 41
 ccagatccct ttctcctgca amnncgcgag mnngttctcm nngaactcmn ncttcagmnn 60
 ggctgcgagm nmnntaggt ctctcgcagg ttctcttgca cagtaataca cggccgtgtc 120

<210> 42
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

<220>
 <223> Cebador 3
 <400> 42
 gcctgaaccg cctccaccac tcgagacggt gaccagggta ccttggcccc agatcccttt 60
 ctctctgcaa 69
 35

<210> 43
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40

<220>
 <223> Cebador Fdseq
 <400> 43
 gaatttctg tatgagg 17
 45

<210> 44
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

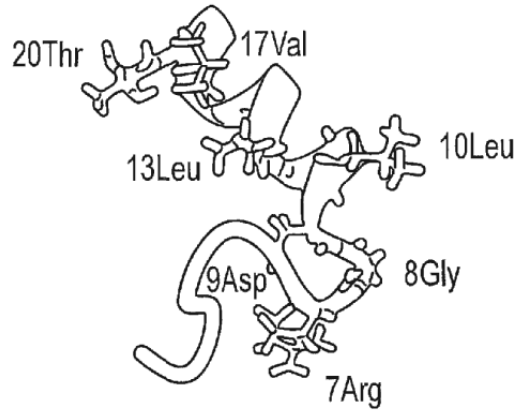
<220>
 <223> Cebador LMB3
 <400> 44
 caggaaacag ctatgac 17
 55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para generar una biblioteca de reactivos de afinidad contra una proteína diana que interactúa con un ligando, en donde la proteína diana es $\alpha V\beta 6$ y en donde el método comprende las siguientes etapas:
- i) generar una biblioteca de péptidos que comprenden una horquilla que contiene en su giro un motivo RGD seguido de una hélice α o una hélice 3_{10} C-terminal; y
- ii) injertar cada péptido de la biblioteca de péptidos en una porción de la molécula de reactivo de afinidad de forma que pueda interactuar con la proteína diana, para producir una biblioteca de reactivos de afinidad.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo de afinidad es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde en la etapa (ii) el péptido se injerta en la posición de una región determinante de complementariedad (CDR) para producir una biblioteca de anticuerpos.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la CDR es CDR3.
- 20 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el reactivo de afinidad es un mimético de anticuerpo.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el mimético de anticuerpo es un Affibody, una DARPin, una Anticalin, una Avimer, un Versabody o una Duocalin.
- 25 7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la hélice α o hélice 3_{10} C-terminal comprende motivos de terminación EP N-terminal y LQEKGI C-terminal.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la hélice α C-terminal con motivos de terminación EP N-terminal y LQEKGI C-terminal tiene la secuencia;
- 30 E₁P₂R₃G₄D₅L₆X₇X₈L₉A₁₀A₁₁R₁₂Z₁₃K₁₄R₁₅Z₁₆F₁₇N₁₈E₁₉Z₂₀L₂₁A₂₂Z₂₃L₂₄Q₂₅E₂₆K₂₇G₂₈I₂₉
- en donde X y Z son restos de aminoácido aleatorios.
- 35 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la hélice 3_{10} con motivos de terminación EP N-terminal y LQEKGI C-terminal tiene la secuencia;
- E₁P₂R₃G₄D₅L₆X₇X₈L₉A₁₀A₁₁Z₁₂L₁₃K₁₄Z₁₅E₁₆F₁₇Z₁₈E₁₉N₂₀Z₂₁L₂₂A₂₃Z₂₄L₂₅Q₂₆E₂₇K₂₈G₂₉I₃₀
- 40 en donde X y Z son restos de aminoácido aleatorios.
10. Un método para seleccionar un reactivo de afinidad que tiene la capacidad de unirse a una proteína $\alpha V\beta 6$, que comprende la etapa de fabricar una biblioteca de reactivos de afinidad contra la proteína $\alpha V\beta 6$ mediante un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente y explorar la biblioteca por la unión a la proteína $\alpha V\beta 6$.
- 45 11. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 31.
12. Un anticuerpo para $\alpha V\beta 6$ que comprende una secuencia de V_H-CDR3 que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 11.
- 50 13. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad.
14. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad es cáncer.
- 55 15. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12 o un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el anticuerpo está conjugado con un agente detectable y/o terapéutico.

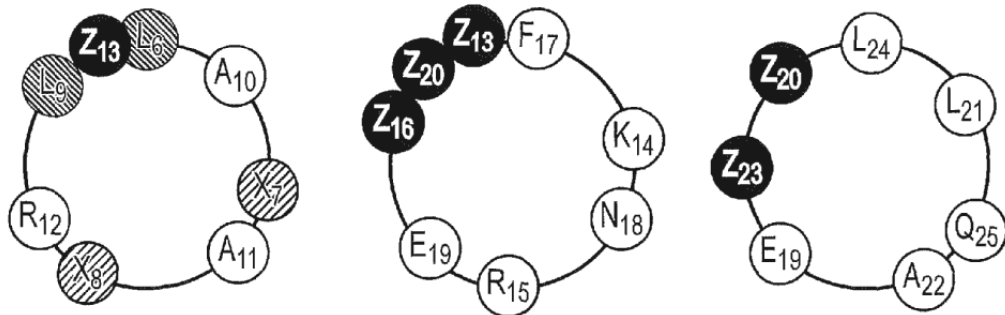
a. Secuencia y estructura determinada por RMN de A20FMDV

N₁A₂V₃P₄N₅L₆R₇G₈D₉L₁₀Q₁₁V₁₂L₁₃A₁₄Q₁₅K₁₆V₁₇A₁₈R₁₉T₂₀



b. Algoritmo para la generación de la biblioteca de hélice α

E₁P₂R₃G₄D₅L₆X₇X₈L₉A₁₀A₁₁R₁₂Z₁₃K₁₄R₁₅Z₁₆F₁₇N₁₈E₁₉Z₂₀L₂₁A₂₂Z₂₃L₂₄Q₂₅E₂₆K₂₇G₂₈I₂₉



E₁P₂R₃G₄D₅L₆X₇X₈L₉A₁₀A₁₁R₁₂Z₁₃K₁₄R₁₅Z₁₆F₁₇N₁₈E₁₉Z₂₀L₂₁A₂₂Z₂₃L₂₄Q₂₅E₂₆K₂₇G₂₈I₂₉

c. Algoritmo para la generación de la biblioteca de hélice 3_{10}

E₁P₂R₃G₄D₅L₆X₇X₈L₉A₁₀A₁₁Z₁₂L₁₃K₁₄Z₁₅E₁₆F₁₇Z₁₈E₁₉N₂₀Z₂₁L₂₂A₂₃Z₂₄L₂₅Q₂₆E₂₇K₂₈G₂₉I₃₀

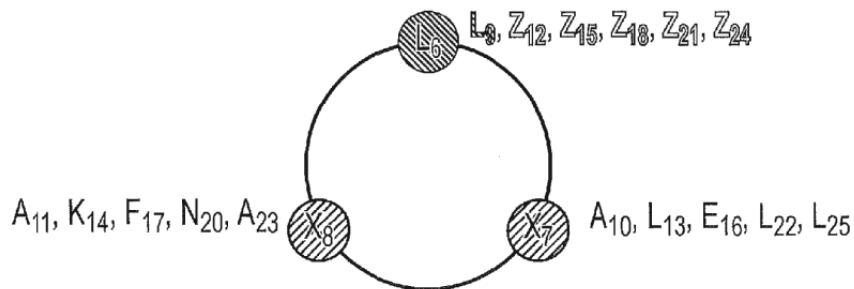


FIG. 1

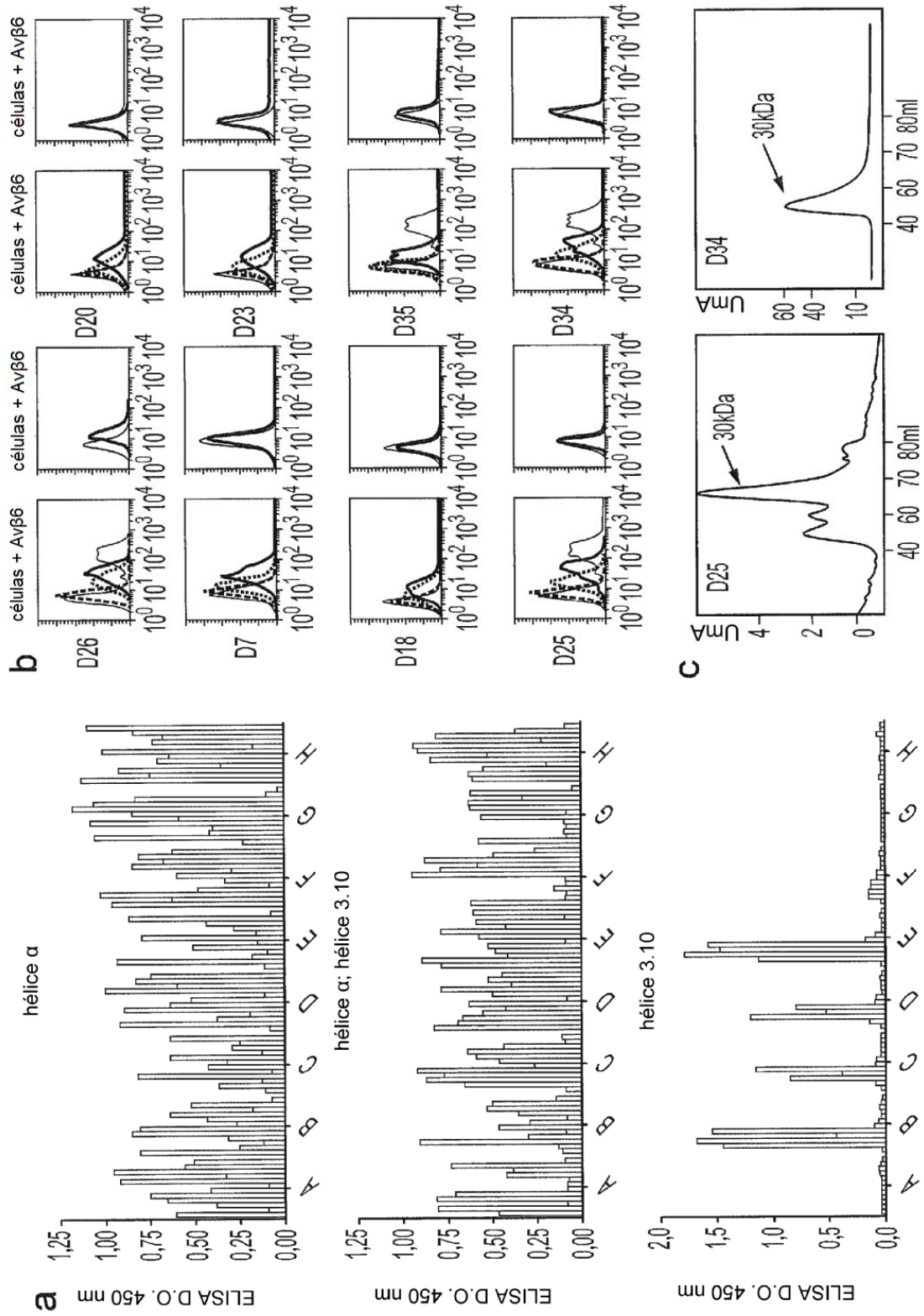


FIG. 2

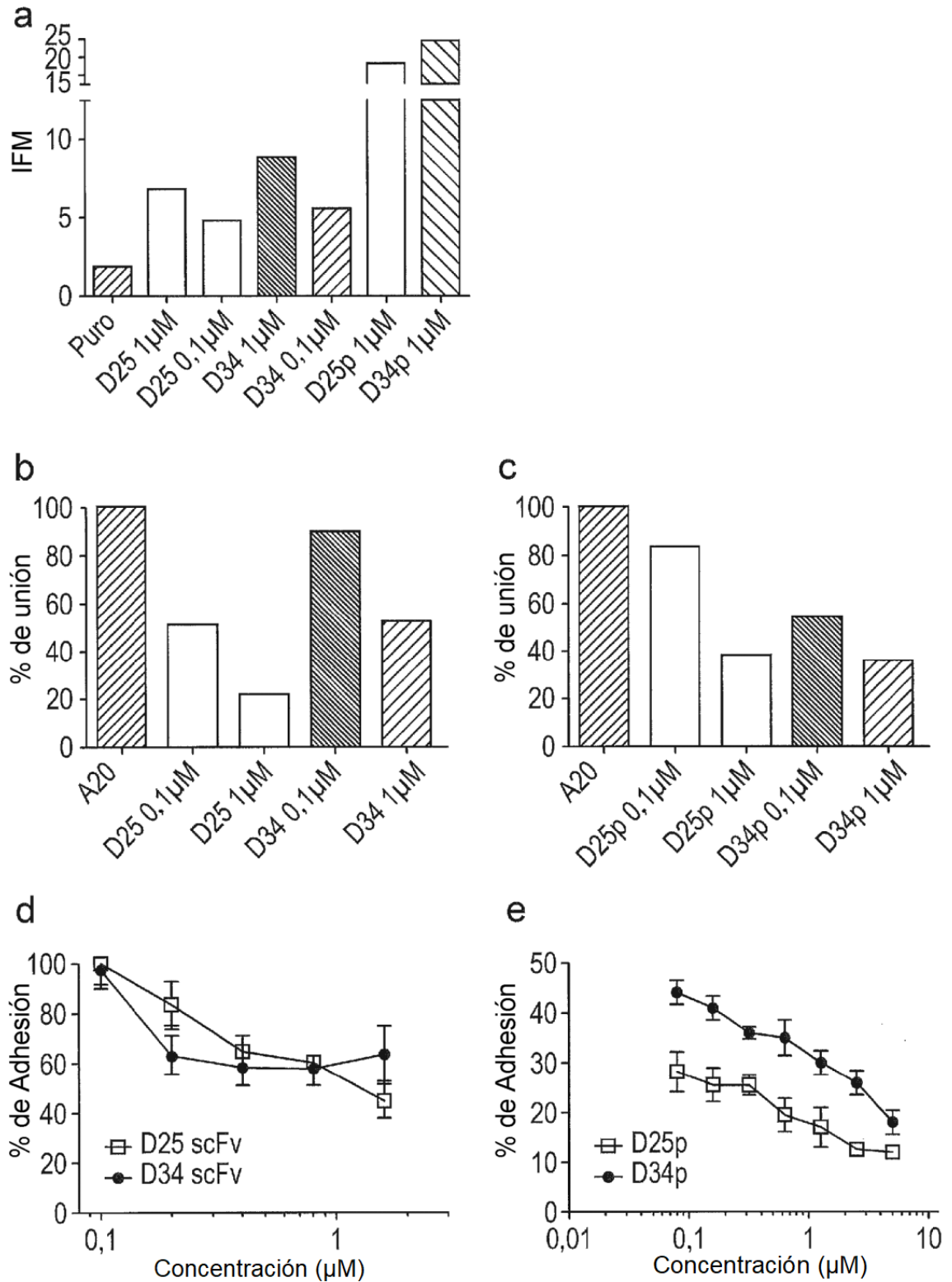


FIG. 3

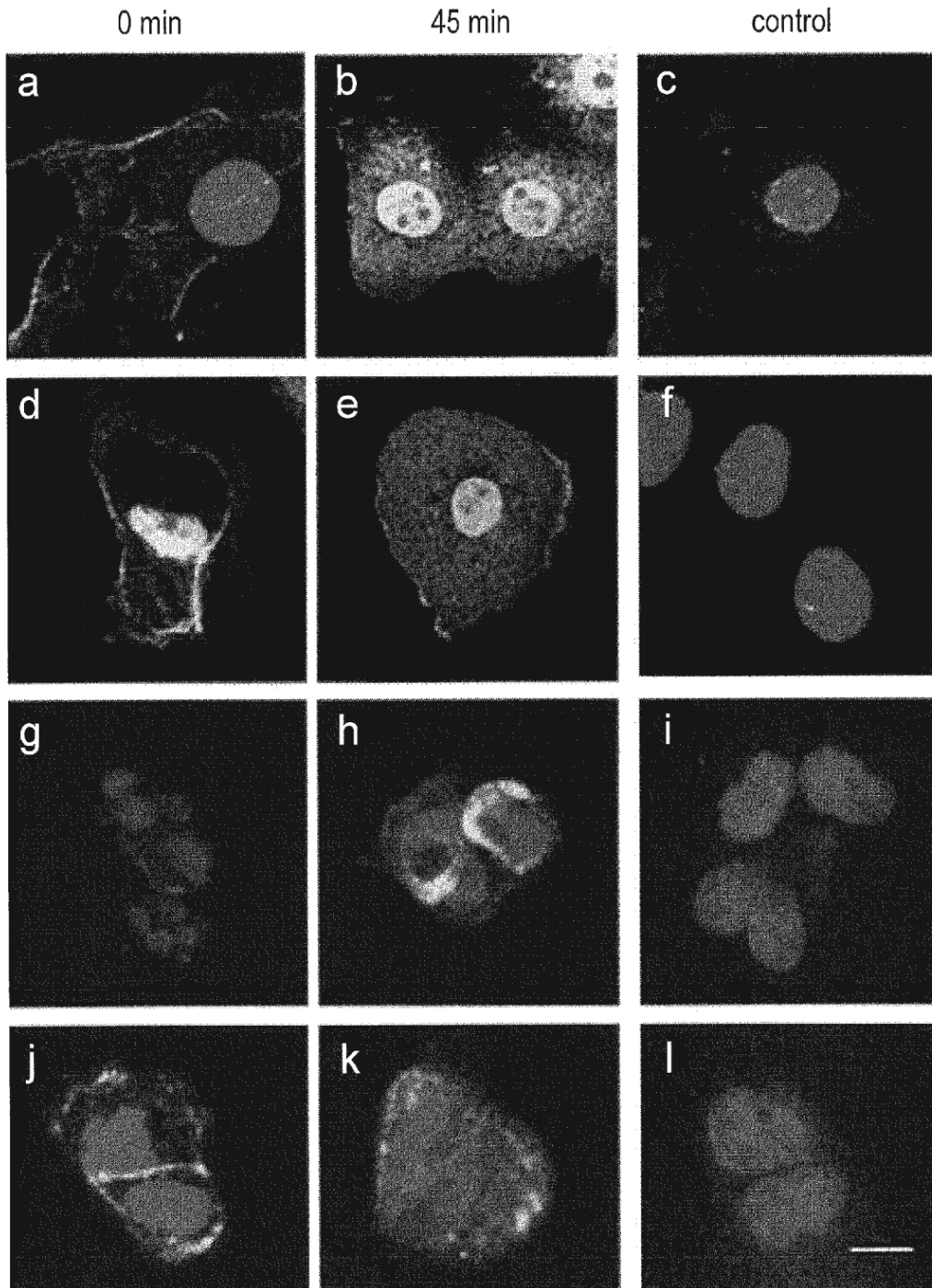


FIG. 4

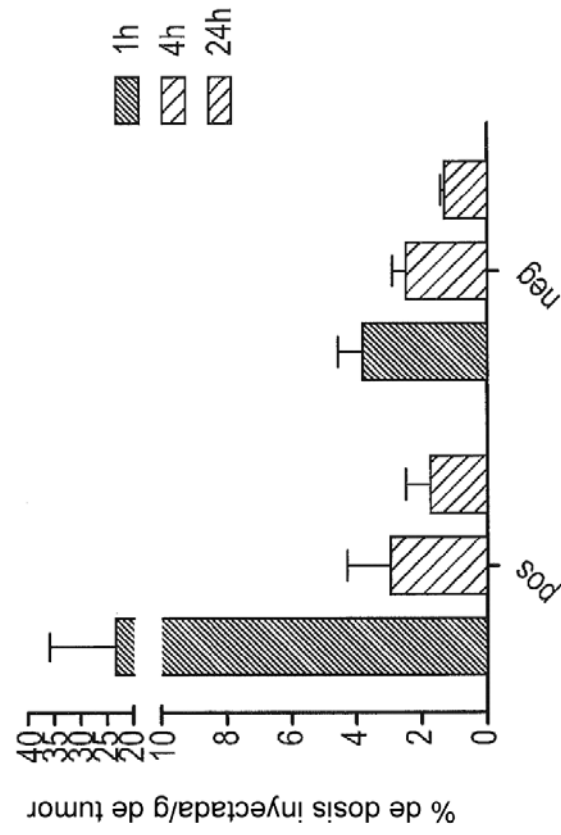
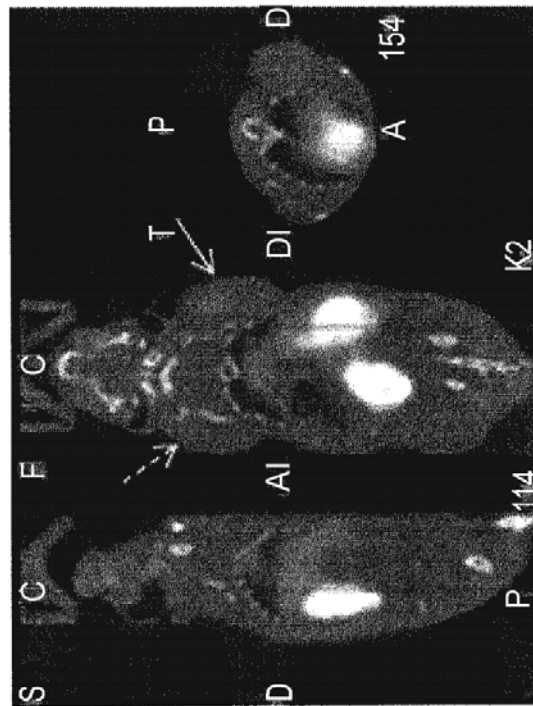
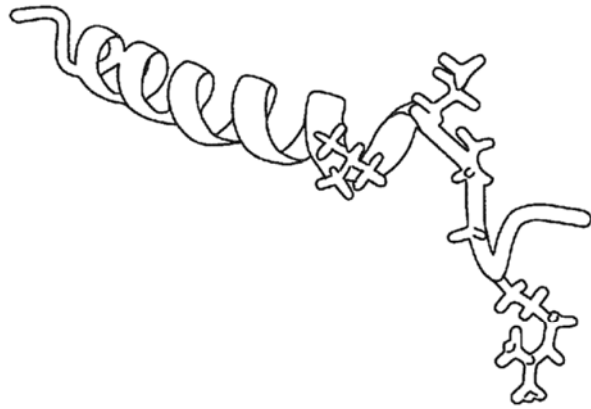


FIG. 5



a. D25p: EPRGDLRTLAAAREKRNFNETLARLQEKGI



b. D34p: QPRGDLRELAARSEAQLQEKGI

FIG. 6

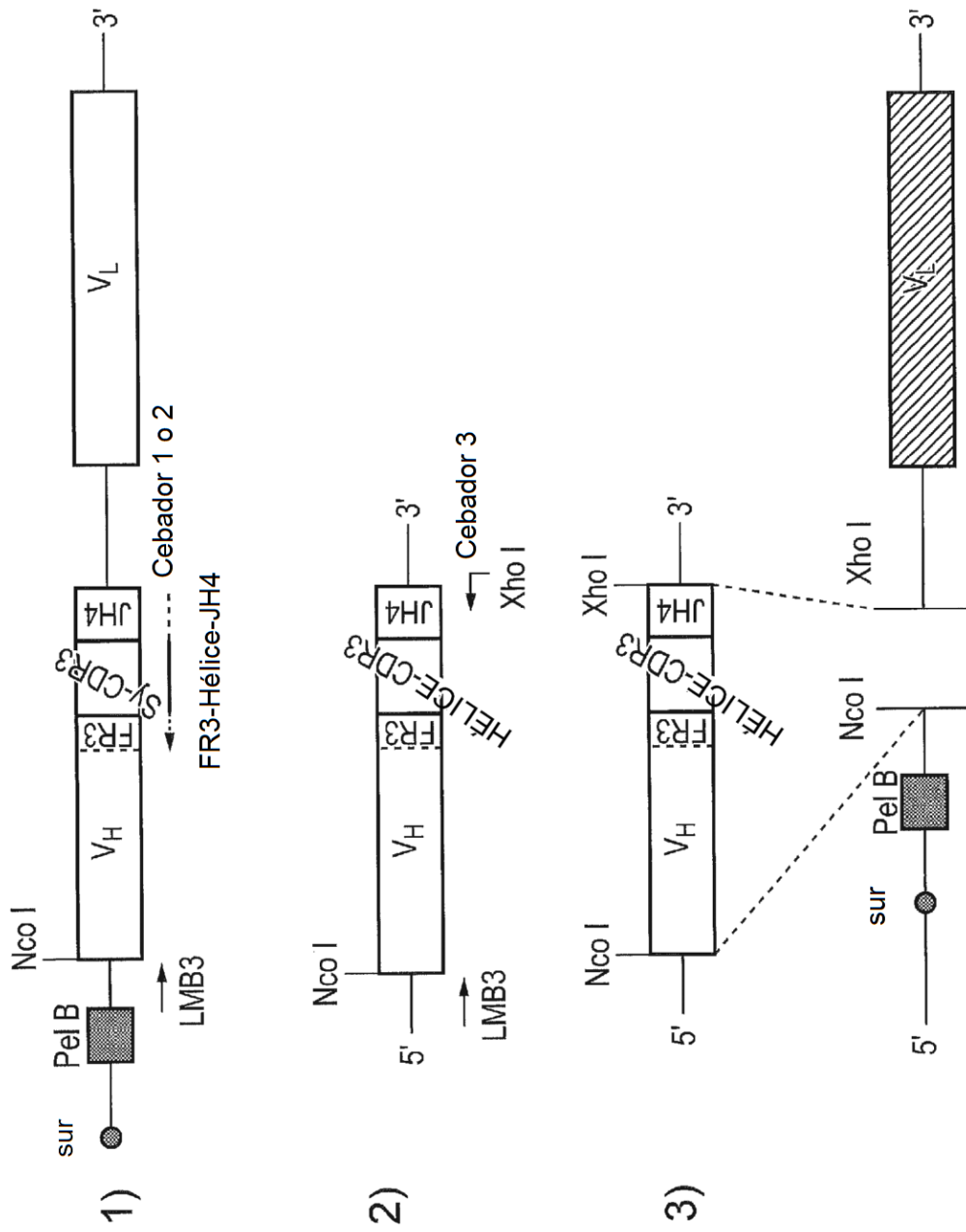


FIG. 7

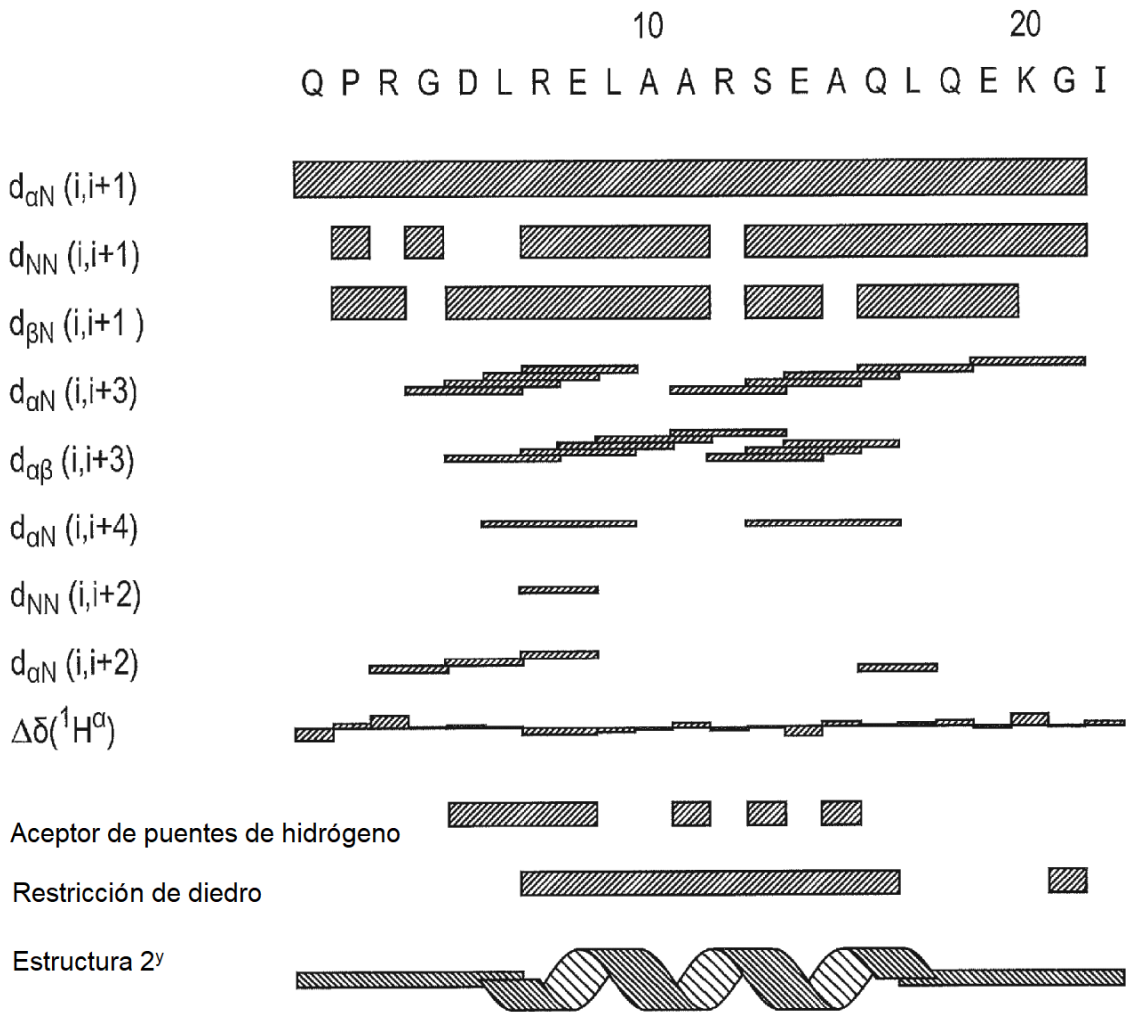


FIG. 8

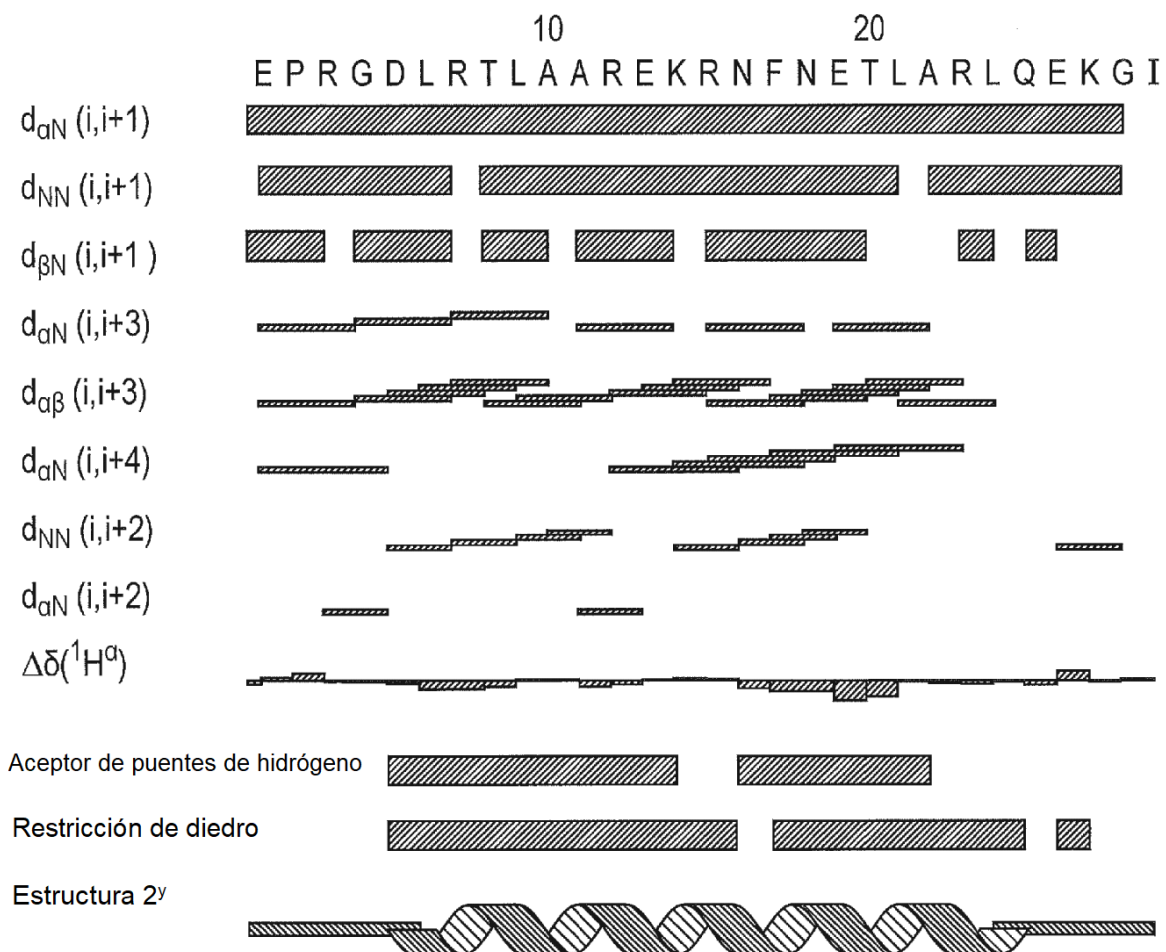


FIG. 9