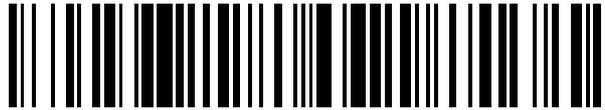


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 926**

21 Número de solicitud: 201830768

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/62 (2007.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.01.2020

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (75.0%)
C/ Pedro Cerbuna 12
50009 Zaragoza ES;
FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA
INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (ARAID)
(5.0%) y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA
DE HIERRO MAJADAHONDA (20.0%)

72 Inventor/es:

ANEL BERNAL, Luis Alberto;
IBÁÑEZ PEREZ, Raquel;
GUERRERO OCHOA, Patricia;
MARTINEZ LOSTAO, Luis;
CONDE GUERRI, Blanca;
HURTADO GUERRERO, Ramón;
SANZ ALCOBER, Ana Laura y
NAVARRO ORTIZ, Rocio

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **GRANULISINA, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y USOS**

57 Resumen:

Granulisina, método de obtención y usos. La presente invención hace referencia al polipéptido granulisina para su uso como medicamento por vía sistémica y a una molécula quimérica que comprende un anticuerpo recombinante dirigido contra un antígeno tumoral y el polipéptido granulisina.

ES 2 738 926 A1

DESCRIPCIÓN

GRANULISINA, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y USOS

CAMPO DE LA INVENCION

- 5** La presente invención pertenece al campo técnico de biotecnología y medicina. En particular, hace referencia al polipéptido granulicina para su uso como medicamento por vía sistémica y a una molécula quimérica que comprende un anticuerpo recombinante dirigido contra un antígeno tumoral, y el polipéptido granulicina. También se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la misma, así como a un vector y a una célula huésped que
- 10** comprenden dicha secuencia. Asimismo, hace referencia a un método para su obtención, así como a una composición farmacéutica y a sus usos médicos, en particular en el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15** La granulicina (GRNLY) es una proteína que se encuentra en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos (CTL) activados y células asesinas naturales (NK) humanas. Durante la respuesta inmune, las células NK liberan GRNLY rápidamente, mientras que la liberación en CTL es 3-5 días después de su activación.

- 20**
- La GRNLY tiene dos isoformas estables con peso molecular de 9 y 15 kDa. La isoforma de 15 kDa se produce rápidamente, tiene una vida media más corta, es secretada constitutivamente, y funciona como una alarmina inmunitaria, aumentando el reclutamiento y la infiltración inflamatoria. La maduración proteolítica de la isoforma de 15 kDa, tanto en el
- 25** extremo amino como en el carboxilo terminal, da como resultado la isoforma de 9 kDa que se produce más lentamente. Los gránulos de baja densidad contienen ambas isoformas, mientras que los gránulos citolíticos de alta densidad contienen solo la isoforma de 9 kDa, lo que sugiere que ésta puede ser la forma madura de la proteína.

- 30** Cuando la GRNLY se libera, aparecen altas concentraciones (en un rango de micromolar) en el área inmediata y la isoforma de 9 kDa podría ejercer citotoxicidad. A una mayor distancia de las células productoras, aparecen concentraciones menores (del rango nanomolar), las cuales son suficientes para que se produzca la migración de células inmunes hacia el sitio de infección (quimiotaxis) y la liberación de factores inmunes

adicionales, expandiendo la respuesta inmune. Sin embargo, este efecto es debido mayoritariamente la isoforma de 15 kDa, y no a la de 9 kDa.

5 La GRNLY de 9 kDa muestra actividad citolítica contra gran variedad de microbios: bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, hongos como *Cryptococcus neoformans*, levaduras como *Candida albicans* o protozoos como *Leishmania major*, siendo ésta su función fisiológica más aceptada. Este efecto sobre este amplio espectro de patógenos es dependiente de la dosis.

10 Por otra parte, la isoforma de la GRNLY recombinante de 9 kDa es también citotóxica sobre células tumorales. El posible papel fisiológico antitumoral de la GRNLY viene apoyado por algunos estudios que demuestran que su expresión en linfocitos T CD8⁺ infiltrados en tumores de colon correlaciona con el mejor pronóstico de los pacientes, u otros en los que se demuestra mejor pronóstico si el nivel de expresión de la GRNLY es alto en células NK

15 periféricas o en el suero en diferentes tipos de cáncer.

La evaluación del mecanismo apoptótico de la GRNLY recombinante se ha llevado a cabo *in vitro* mayoritariamente utilizando la línea celular Jurkat, una leucemia linfocítica aguda de tipo T y líneas celulares derivadas.

20 Asimismo, se ha descrito que la GRNLY actúa también sobre diversas líneas celulares de mieloma múltiple humano, así como *ex vivo* sobre células de pacientes de leucemia linfática crónica de células B, siendo inocua sobre linfocitos de sangre periférica obtenidos de donantes sanos. Se ha descrito también que la GRNLY actúa *in vivo* sobre tumores

25 inyectados en ratones transgénicos que expresaban GRNLY humana.

Más recientemente, nuestro grupo de investigación ha realizado estudios *in vivo* usando la GRNLY recombinante en dos modelos de xenotrasplante de tumores humanos en ratones atímicos, el adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 y el mieloma múltiple NCI-H929,

30 obteniéndose resultados positivos. En concreto se detuvo el crecimiento del tumor mamario y se erradicaron los tumores producidos por el mieloma múltiple. Estos resultados se correlacionaron con la aparición de células tumorales apoptóticas en el tumor, así como con la infiltración de células NK presentes en estos ratones.

Todos estos estudios se han realizado con GRNLY recombinante producida en bacterias. Estas proteínas recombinantes suelen contener lipopolisacárido (LPS). De cara a la posible aplicación clínica de GRNLY, sería deseable poder producir GRNLY recombinante sin LPS ya que el LPS podría producir reacciones inmunitarias exacerbadas como la sepsis.

5

Recientemente, otro grupo de investigación ha producido GRNLY recombinante de 9 kDa en *Pichia pastoris* utilizando una estrategia de fermentación simple en la que se menciona que la GRNLY muestra toxicidad contra bacterias de una manera dependiente de la dosis. Asimismo, los inventores junto con colaboradores, pusieron a punto recientemente la producción de GRNLY recombinante en *Pichia pastoris*.

10

Los inventores han descrito previamente que la GRNLY induce la muerte celular en células tumorales mediante activación de la vía apoptótica mitocondrial y, en especial del factor inductor de apoptosis (AIF), pero no tanto de las caspasas, constituyendo un nuevo mecanismo en la citotoxicidad inducida por las células efectoras del sistema inmune. El hecho de que el mecanismo de inducción de muerte sea diferente del mecanismo clásico de la apoptosis, dependiente de caspasas, hace que la granulicina pueda ser una alternativa a los tratamientos anti-tumorales convencionales.

15

WO2014/122351 menciona que la introducción directa de GRNLY o de un gen que codifique para dicha proteína en células malignas *in vivo* o la introducción directa de esta proteína en la zona donde esté localizado el tumor, puede proporcionar un tratamiento efectivo de tumores localizados, tales como los tumores sólidos y se describe la administración *in vivo* de GRNLY por inyección intratumoral. Aunque esta técnica se puede usar en el tratamiento de tumores en la clínica mediante la administración intratumoral, sería deseable poder administrar de forma sistémica la GRNLY para facilitar su aplicación a todo tipo de tumores, puesto que la administración intratumoral está limitada a aquellos tumores primarios o metástasis que sean accesibles para inyección directa.

20

25

Para permitir que los anticuerpos actúen como agentes anticancerígenos citotóxicos, se ha descrito su modificación mediante unión a toxinas o a agentes citotóxicos de bajo peso molecular. Dichas moléculas se denominan inmunotoxinas o fármacos conjugados a anticuerpos (antibody drug conjugates), respectivamente. Dicha estrategia permite la administración de dichos compuestos directamente en el tumor, gracias a la especificidad de anticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie celular de las células cancerígenas.

30

35

A pesar de los conocidos beneficios asociados a la eliminación selectiva de las células malignas, existen numerosos problemas prácticos que limitan el uso terapéutico de los conjugados, incluyendo su captación celular ineficiente, baja citotoxicidad y efectos tóxicos en lugares distintos al sitio del tumor.

5

Así pues, uno de los problemas técnicos subyacentes de la presente invención, es proporcionar medios para la administración sistémica de granulicina para su uso como antitumoral en el tratamiento del cáncer, tanto de tumores sólidos como hematológicos.

10 BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia al polipéptido granulicina para su uso como medicamento por vía sistémica y a una molécula quimérica que comprende un anticuerpo recombinante dirigido contra un antígeno tumoral, y el polipéptido granulicina. Las moléculas

15

son usadas para el tratamiento tanto de tumores sólidos como de tumores hematológicos.

En la presente invención se ha logrado con éxito la expresión de las proteínas recombinantes GRNLY de 9 kDa y, la quimera formada por el scFv anti-CEA y la GRNLY en *Pichia Pastoris*. Para ello, se ha usado un plásmido integrativo de levadura (YIP) con el que

20

se ha transfectado *P. pastoris* y se ha conseguido que el inserto deseado se integre en su genoma, se mantenga de forma estable y se transmita a la descendencia (**Ejemplo 2**). La inducción de la expresión de las proteínas recombinantes se realizó a pH 5 y a 18°C, ya que se observó que a este pH se producía una óptima expresión de las mismas (**Figura 4**). Asimismo, al utilizar una Tª de 18°C se observó una reducción en la producción de otras

25

proteínas de *P.pastoris*, lo cual constituye una ventaja, al facilitar el proceso de purificación (**Figura 4A**).

Tras su purificación (**Ejemplo 3**), los inventores demostraron que la proteína quimérica conserva su funcionalidad. En primer lugar se determinó que la quimera se une

30

específicamente al antígeno CEA a través del scFv que contiene, tanto por ELISA utilizando el antígeno purificado, como por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia sobre células enteras (**Ejemplo 4**).

Por otra parte, se demostró que la quimera conserva la capacidad citotóxica de la GRNLY

35

(**Ejemplo 5**), tanto sobre células Jurkat (leucemia linfocítica aguda de tipo T) como sobre células HT29 (cáncer de colon).

La conservación de la funcionalidad en las dos partes de la molécula no era evidente, ya que podrían haberse producido cambios conformacionales que hubieran hecho perder o reducir la capacidad de unión a CEA del scFv o bien la actividad citotóxica de la GRNLY.

5

En el caso de las células Jurkat, cabe destacar que la citotoxicidad inducida por la quimera expresada en *P. pastoris* es mayor que la que induce la GRNLY de 9 kDa expresada tanto en *Escherichia coli* como en *P. pastoris* (**Figura 10**). Para obtener un 90% de toxicidad en tiempos de incubación entre 16 y 24 horas se precisaban concentraciones de alrededor de 50 μ M de la GRNLY de 9 kDa expresada en *E. coli* [Aporta, A., et al., *Biochem Pharmacol*, 2014. 87(3): p. 410-23] y de alrededor de 15 μ M GRNLY de 9 kDa expresada en *P. pastoris* [Ibáñez, R., *Universidad de Zaragoza*. 2015], mientras que en el caso de la quimera se obtienen resultados similares a una concentración de únicamente 6 μ M expresada también en *P. pastoris*. Estos resultados indican que no solo no se pierde la actividad citolítica de la GRNLY contra células de un cáncer hematológico, como la leucemia de células T, sino que la quimera posee una mayor actividad citolítica.

10

15

20

25

Por otra parte, cabe destacar que la citotoxicidad inducida por la quimera expresada en *P. pastoris* es también mayor en células HT29 que la que induce la GRNLY de 9 kDa expresada en *P. pastoris*. Para obtener un 70% de inhibición de crecimiento con respecto al control tras 24 horas se precisan concentraciones de alrededor de 20 μ M de la GRNLY de 9 kDa expresada en *P. pastoris*, mientras que sólo se necesitan concentraciones de alrededor de 6 μ M de la quimera (**Figura 11**). Este hecho muestra, no solo que no se pierde la actividad citolítica de la GRNLY contra células de un tumor sólido como el cáncer de colon, sino que, la quimera posee también una mayor actividad citolítica.

30

La muerte celular que produce la quimera en las células HT29 es mayoritariamente apoptótica, debido a que, se observa un aumento en la población de células que exponen fosfatidilserina en la bicapa externa de la membrana celular pero que todavía no han perdido su integridad de membrana (**Figura 12**).

35

Estos resultados sugieren que una quimera de granulicina es una buena estrategia para conseguir una administración sistémica de la granulicina, donde la granulicina llegue al lugar donde se encuentra el tumor en concentraciones suficientemente altas para ejercer su actividad citotóxica, especialmente, cuando dicha quimera forma parte de una única cadena polipeptídica y ha sido producida en *P. pastoris*.

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a una molécula (en adelante molécula de la invención) que comprende: a) un anticuerpo recombinante dirigido contra un antígeno tumoral, y b) el polipéptido granulisina que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1:

5

GRDYRTCLTIVQKLKMKMVDKPTQRSVSNAATRVCRTGRSRWRDVCRNFMRRYQSRVIQGL
VAGETAQQICEDLRGS

10 o una variante de la misma con al menos un 85% de identidad; donde dicho anticuerpo recombinante y dicho polipéptido granulisina forman parte de una única cadena polipeptídica; y donde dicho anticuerpo recombinante es un polipéptido monocatenario.

15 En un aspecto preferido, la presente invención hace referencia al polipéptido granulisina que comprende la secuencia SEQ ID NO:1 o una variante de la misma con al menos un 85% de identidad, para ser usada como medicamento, caracterizada porque la granulisina se administra por vía sistémica. En un aspecto aún más preferido la presente invención hace referencia al polipéptido granulisina que comprende la secuencia SEQ ID NO:1 o una variante de la misma con al menos un 85% de identidad, según la reivindicación 1, para ser usada en el tratamiento de tumores hematológicos o sólidos, caracterizada porque la **20** granulisina se administra por vía sistémica.

25 El polipéptido granulisina (GRNLY) es una proteína producida por los linfocitos T citolíticos y células asesinas naturales. Tiene dos isoformas estables con peso molecular de 9 y 15 kDa. La granulisina recombinante de 9 kDa muestra actividad citolítica contra una variedad de microbios y también contra líneas celulares tumorales, debido a que induce la apoptosis celular. En una realización particular, el polipéptido granulisina es la isoforma de 9 kDa.

30 El polipéptido granulisina puede ser de cualquier organismo que produce tal polipéptido, preferiblemente de mamíferos, más preferiblemente de humanos. En una realización particular, el polipéptido granulisina es humano y comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la isoforma de 9 kDa de la granulisina humana. Se hace notar que pequeñas modificaciones en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 que no alteren la funcionalidad terapéutica de la granulisina también quedarían englobadas por la presente invención. En una realización preferida, el polipéptido granulisina consiste en la secuencia **35** SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma con al menos un 75% de identidad, preferiblemente con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, y más

preferiblemente con al menos un 95% de identidad. En una realización más preferida, el polipéptido granulicina consiste en la secuencia SEQ ID NO:1.

5 La región carboxilo terminal de la isoforma de 9 kDa contiene un dominio de la familia SAPLIP, lo que sugiere que puede ejercer su función citolítica a través de la interacción con lípidos, ya que las proteínas de esta familia interaccionan con una gran variedad de lípidos, especialmente colesterol y esfingolípidos.

10 La GRNLY de 9 kDa es una proteína básica de 74 residuos, rica en argininas y compuesta por 5 hélices alfa espaciadas por tres giros, y cuya superficie tiene mayoritariamente carga positiva. Estas cargas positivas se distribuyen principalmente en un anillo alrededor de la molécula, aproximadamente donde se sitúan las hélices II y III (**Figura 1**).

15 Las hélices II y III son importantes para la lisis, ya que péptidos sintéticos derivados de la GRNLY que corresponden a la región central son citotóxicos sobre células Jurkat y lisan bacterias de *Salmonella*, mientras que péptidos de las regiones amino o carboxilo no tienen esta actividad. Sin embargo, estos péptidos derivados de la GRNLY, pero no la proteína entera, son hemolíticos sobre eritrocitos. Las cargas positivas de la superficie de la GRNLY, sobre todo los residuos básicos de las hélices II y III (conservados en otras proteínas de la

20 misma familia como NK-lisina, parecen orientar la molécula hacia la superficie cargada negativamente de los microbios o de las células tumorales. Las cargas positivas no involucradas en el contacto inicial con sus dianas podrían mantener a la GRNLY en la superficie de membrana. Las moléculas de GRNLY se insertan en la membrana perturbando su estructura individualmente o en pequeños grupos, girando en la dirección de las hélices I,

25 II y III y exponiendo la superficie lítica. Además, los puentes disulfuro de la GRNLY parecen ser necesarios para la lisis de células tumorales. Se forman puentes disulfuro intramoleculares entre las hélices I y V y entre las hélices II y III. Sin embargo, la lisis bacteriana no depende de estos puentes disulfuro, es más, la GRNLY muestra mejor actividad lítica después de su eliminación tras reducción y calentamiento. Esto sugiere que

30 los mecanismos de lisis de bacteria y de células tumorales son distintos.

35 La GRNLY distingue entre células procariontas y eucariotas por la composición lipídica de sus membranas. La membrana eucariota de una célula contiene colesterol, esfingomielina y fosfolípidos; mientras que la membrana procarionta generalmente no contiene colesterol ni esfingomielina. La GRNLY se une a membranas negativamente cargadas, pudiendo ser endocitada.

Por otra parte, la GRNLY mata a las bacterias produciendo poros en su superficie y pérdida del equilibrio osmótico. La GRNLY permite la entrada de granzima B en bacterias y en parásitos unicelulares.

5

La GRNLY induce apoptosis a través de una vía dependiente y otra independiente de ceramida. La vía independiente de la generación de ceramida es más rápida y se detecta tras 1-5 horas de incubación. La GRNLY se inserta en la membrana plasmática de sus células diana, produciendo un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. El aumento

10

de la concentración de calcio intracelular produce la generación de ROS mitocondriales, lo cual conduce a una caída del potencial de membrana mitocondial, con liberación de cyt c y de AIF de la mitocondria. El cyt c, una vez en el citoplasma, forma el apoptosoma junto con Apaf-1 y la procaspasa-9, produciéndose la activación de esta última y de las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3, que acaba causando fragmentación nuclear. Por otra parte,

15

AIF se transloca al núcleo provocando la condensación de la cromatina y degradación del DNA independiente de caspasas (**Figura 2**). Se ha demostrado también que más lentamente (se detecta tras más de 12 horas de incubación, se produce una activación de esfingomielinasas, que causan la acumulación de ceramida, contribuyendo también a la activación de la vía apoptótica mitocondial. Sin embargo, la generación de ceramida no

20

parece ser esencial para la muerte celular inducida por GRNLY.

En un aspecto preferido de la invención, el anticuerpo recombinante está situado en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica y se encuentra físicamente unido, opcionalmente mediante un conector peptídico, al polipéptido granzulina, donde el

25

polipéptido granzulina está opcionalmente unido a una secuencia de polihistidina.

En un aspecto preferido de la invención dicho polipéptido granzulina consiste en la SEQ ID NO: 1.

30

En un aspecto preferido de la invención dicho anticuerpo recombinante es seleccionado entre un fragmento variable de cadena única (scFv) y un anticuerpo de dominio único (sdAb), preferiblemente dicho anticuerpo recombinante es un scFv.

35

En un aspecto preferido de la invención dicho anticuerpo recombinante está dirigido frente a un antígeno tumoral característico de uno o más tipos de tumores hematológicos o sólidos. Dicho un anticuerpo recombinante dirigido contra un antígeno tumoral puede estar dirigido

contra cualquier antígeno tumoral. Se han descrito antígenos tumorales característicos de distintos tipos de cáncer, tales como cánceres hemáticos (por ejemplo, leucemia, linfoma y mieloma múltiple) y tumores sólidos.

5 En una realización particular, dicho anticuerpo recombinante está dirigido frente a un antígeno tumoral característico. Por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario (CEA) en carcinomas de colon; CD19 ó CD20 en leucemias de tipo B; Her2-neu ó EpCAM en adenocarcinomas mamarios; CS1 en mieloma múltiple; o el antígeno Tn en diversos tipos de cáncer.

10 En un aspecto preferido de la invención dicho anticuerpo recombinante comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2:

15 QVKLQQSGAELVRSQTSVKLSCTASGFNIKDSYMHWLRQGPEQGLEWIGWIDPENGDT
 APKFQGKATFTTDTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNEGTPYFDYWGQGTSTVTVSSG
 GGGSGGGGSGGGGSENVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKL
 WIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK
 R

20 El anticuerpo recombinante de SEQ ID NO: 2 MFE23 es un scFv que presenta alta afinidad ($K_d = 2,5 \pm 1,3$ nM) por el antígeno carcinoembrionario (CEA).

Dicho anticuerpo recombinante y el polipéptido granulicina pueden conjugarse mediante conectores químicos o peptídicos. Existe un gran número de conectores bien conocidos en el estado del arte y se describen por ejemplo en Dosio et al. [Toxins 2011, 3, 848-883] y en Ghetie y Vitteta [Mol Biotechnol 2001, 18(3), 251-68]. En un aspecto preferido de la invención dicho conector peptídico tiene una longitud de 5 a 40 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 30 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 20 aminoácidos. En un aspecto preferido, dicho conector peptídico comprende 2 o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Gly, Ser, Ala y Thr. En un aspecto aún más preferido dicho conector peptídico comprende la secuencia SEQ ID NO: 3:

AAANSAGGSGGSSGSDGASGR

35 En un aspecto preferido la molécula de la invención comprende o consiste en un anticuerpo recombinante anti-CEA scFv MFE23 que a su vez comprende o consiste en la SEQ ID NO:

2, un polipéptido granulicina que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 y un conector peptídico que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3.

5 En un aspecto preferido la molécula de la invención comprende o consiste en el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 4:

**QVKLQQSGAELVRSVSVKLSCTASGFNIKDSYMHVLRQGPEQGLEWIGWIDPENGDTE
YAPKFQGKATFTTDTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNEGTPGYYFDYWGGQTTVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSENVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSVSYMHWFQQKPGTSP
10 KLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKL
ELKRAAANSAGGSGGSSGSDGASGRGRDYRTCLTIVQKLKMKMVDKPTQRSVSNATR
VCRTGRSRWRDVCRNFMRRYQSRVIQGLVAGETAQQICEDLRGSHHHHHH.**

15 Un segundo aspecto de la invención hace referencia a la molécula de la invención donde dicha molécula ha sido producida mediante un proceso que comprende las siguientes etapas: a) introducción de un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en una célula huésped apropiada; b) cultivo de la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ácido nucleico; y c) 20 opcionalmente, aislar y / o purificar el polipéptido expresado; donde dicha célula huésped es una célula eucariota. En un aspecto preferido la célula huésped es *Pichia pastoris*.

25 El tercer aspecto de la invención hace referencia a un ácido nucleico que codifica para la molécula de la invención arriba definida. En un aspecto preferido donde dicha secuencia comprende además una secuencia que codifica un péptido señal, preferiblemente donde dicho péptido señal es el factor alpha.

30 El cuarto aspecto de la invención hace referencia a un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico arriba descrita.

El quinto aspecto de la invención hace referencia a una célula huésped que comprende el vector de expresión arriba descrito.

35 El sexto aspecto de la invención hace referencia a una composición que comprende la molécula de la invención, una secuencia de ácido nucleico que codifique para la misma, un vector de expresión que comprenda dicha secuencia de ácido nucleico o una célula huésped

que comprenda el vector de expresión arriba descrito. En un aspecto preferido, dicha composición es una composición farmacéutica que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5** El séptimo aspecto de la invención hace referencia a la molécula de la invención, una secuencia de ácido nucleico que codifique para la misma, un vector de expresión que comprenda dicha secuencia de ácido nucleico o una célula huésped que comprenda el vector de expresión arriba descrito, para su uso como medicamento. Alternativamente, este aspecto de la invención hace referencia a un método de tratamiento de pacientes que
- 10** comprende la administración de la molécula de la invención, una secuencia de ácido nucleico que codifique para la misma, un vector de expresión que comprenda dicha secuencia de ácido nucleico o una célula huésped que comprenda el vector de expresión arriba descrito. En un aspecto preferido, la administración se realiza por vía sistémica.
- 15** El octavo aspecto de la invención hace referencia a la molécula de la invención, una secuencia de ácido nucleico que codifique para la misma, un vector de expresión que comprenda dicha secuencia de ácido nucleico o una célula huésped que comprenda el vector de expresión arriba descrito, para su uso en el tratamiento tumores hematológicos o sólidos. Alternativamente, este aspecto de la invención hace referencia a un método de
- 20** tratamiento de pacientes con tumores hematológicos o sólidos que comprende la administración de la molécula de la invención, una secuencia de ácido nucleico que codifique para la misma, un vector de expresión que comprenda dicha secuencia de ácido nucleico o una célula huésped que comprenda el vector de expresión arriba descrito. En un aspecto preferido, la administración se realiza por vía sistémica.
- 25**
- El noveno aspecto de la invención hace referencia a un proceso para la producción de la molécula de la invención, que comprende las etapas de: a) introducción de un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16 en una célula huésped apropiada; b) cultivo de la célula
- 30** huésped en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ácido nucleico; c) opcionalmente, aislar y / o purificar el polipéptido expresado. En un aspecto preferido dicho proceso comprende una etapa b) que se realiza a un pH de entre 4.9 y 5.2, preferiblemente a un pH de 5, y a una temperatura de entre 15 y 21 grados, preferiblemente de 18°C.
- 35** Con el propósito de ilustrar la invención se incluyen las siguientes definiciones:

El término "anticuerpo recombinante" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo producido o expresado utilizando un vector de expresión recombinante, donde el vector de expresión comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo recombinante, tal que la introducción del vector de expresión en una célula huésped apropiada resulta en la producción o expresión del anticuerpo recombinante.

5

El término "identidad" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Dos o más secuencias (polinucleótidos o polipéptidos) pueden ser comparadas determinando su "porcentaje de identidad". El "porcentaje de identidad" de dos secuencias es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Existen programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias que son bien conocidos en la técnica, tales como el programa BLAST del NCBI, que se puede utilizar, por ejemplo, con los parámetros por defecto (<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>). El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, diabodies), anticuerpos de dominio único y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

10

15

20

El término "anticuerpo de dominio único" (sdAb) tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que constan de un único dominio V_H. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, anticuerpos de un solo dominio derivados de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, anticuerpos de ingeniería y miméticos de anticuerpos. Anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de la técnica, o cualquier formato futuro de anticuerpos de un solo dominio. Anticuerpos de dominio único se pueden derivar de cualquier especie, incluyendo, pero no limitado a ratón, humano, camello, llama, cabra, conejo, bovino, o tiburón. En una realización preferida, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único de origen natural conocido como anticuerpo de cadena pesada desprovista de cadenas ligeras. Tales anticuerpos de un solo dominio se describen por ejemplo en WO94/04678. Por razones de claridad, este dominio variable derivada de un anticuerpo de cadena pesada naturalmente desprovista de cadena ligera se conoce en el presente documento como un VHH o nanocuerpos para distinguirla de la VH convencional

30

35

de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Tal molécula de VHH se puede derivar de anticuerpos producidos en las especies de Camelidae, por ejemplo en camello, dromedario, llama, alpaca y guanaco. Otras especies, además de camélidos pueden producir anticuerpos de cadena pesada naturalmente carente de cadena ligera; tales VHH quedarían también englobadas por la presente invención.

El término "mimético de anticuerpo" (ABM) tal como se utiliza aquí, se refiere al armazón o estructura básica de un solo dominio, que han sido diseñados para unirse a dianas terapéuticas con afinidad y especificidad como los anticuerpos naturales. Miméticos de anticuerpos se han desarrollado utilizando un pliegue o dominio similar al de la inmunoglobulina, por ejemplo, fibronectina tipo III, NCAM y CTLA-4. También se han obtenido otras estructuras miméticas que no guardan similitud con dominios o fragmentos de inmunoglobulina. Ejemplos no limitantes de los mismos son DARPin, anticalins, anticuerpos, adnectins, fynomers, etc. (véase, por ejemplo, Weidle et al *Cancer Genomics and Proteomics* 2013, 10:1-18; Lofblom, J. et al, *Curr Opin Biotechnol* 2011, 22: 843-848; Banta, S. et al., *Annu Rev. Biomed Eng*, 2010, 15: 93-113).

Los scFv ("single chain fragment variable") son dominios funcionales de unión a antígeno de los anticuerpos que mantienen su especificidad de unión, ya que están compuestos por los fragmentos de sus cadenas variables, tanto de la cadena ligera como de la pesada (V_L y V_H), que reconocen efectivamente a los determinantes antigénicos. Estas cadenas permanecen unidas por un conector peptídico corto y flexible, cuyo tamaño y composición de aminoácidos es esencial para no afectar la habilidad de los dominios para plegarse correctamente y formar un sitio de unión a antígeno correcto [Huston, J.S., et al., *Methods Enzymol*, 1991. 203: p. 46-88; Maynard, J., et.al., *Annu Rev Biomed Eng*, 2000. 2: p. 339-76]. El conector normalmente mide alrededor de 3,5 nm y preferiblemente contiene residuos hidrofílicos para evitar que se intercale dentro o entre los dominios variables durante el plegamiento [Argos, P., *J Mol Biol*, 1990. 211(4): p. 943-58]. Normalmente, el conector contiene residuos de Gly y Ser para dar flexibilidad y residuos de Glu y Lys para mejorar la solubilidad [Whitlow, M., et al., *Protein Eng*, 1993. 6(8): p. 989-95; Alfthan, K., et al., *Protein Eng*, 1995. 8(7): p. 725-31].

En una realización preferida, dicho anticuerpo recombinante es seleccionado entre un fragmento variable de cadena única (scFv) y un anticuerpo de dominio único (sdAb), preferiblemente dicho anticuerpo recombinante es un scFv.

El término “antígeno tumoral” hace referencia a antígenos de superficie celular sobreexpresados, mutados o expresados en células cancerosas de forma selectiva en comparación con tejidos normales. Idealmente, dicho antígeno tumoral debe ser abundante y accesible y ser expresado de forma homogénea, constante y exclusivamente en la superficie de las células cancerosas. En general, los antígenos tumorales reconocidos por anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden agruparse en varias categorías diferentes [Scott et al., *Nature Reviews Cancer* **12**, 278-287, en particular Tabla 2]. Los antígenos de diferenciación hematopoyéticos son glicoproteínas generalmente asociadas con grupo de diferenciación (“cluster of differentiation”, CD) tales como CD20, CD30, CD33 y CD52. Los antígenos de diferenciación de superficie celular son un grupo diverso de glicoproteínas e hidratos de carbono que se encuentran en la superficie celular tanto de las células normales como tumorales. Los antígenos involucrados en rutas de señalización asociadas al crecimiento y a la diferenciación son habitualmente factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento. Algunos factores de crecimiento que han sido descritos como dianas para anticuerpos en pacientes con cáncer incluyen CEA2, EGFR (también conocido como ErbB1), erbB2 (también conocido como HER2), ERBB3, MET (también conocido como HGFR), IGF1R, EphA3, TRAILR1 (también conocido como TNFRSF10A), TRAILR2 (también conocido como TNFRSF10B) y RANKL (también conocido como TNFSF11). Los antígenos implicados en la angiogénesis son generalmente proteínas o factores de crecimiento que dan soporte a la formación de nueva microvasculatura, e incluyen VEGF, VEGFR, la integrina $\alpha V\beta 3$ y la integrina $\alpha 5\beta 1$. Finalmente, el estroma del tumor y la matriz extracelular son estructuras de apoyo indispensables para un tumor. Así pues, antígenos del estroma y la matriz extracelular son también dianas terapéuticas e incluyen la proteína de activación de fibroblastos (FAP) y la tenascina. Cualquiera de dichos antígenos tumorales está también incluido dentro del ámbito de la invención. En la Tabla 2 de Scott et al., se especifica asimismo para cada uno de los antígenos tumorales que tipos de cáncer los expresan.

El término “tumor sólido” (o “tumor sólido canceroso”) en este contexto se refiere a aquellas masas anormales de tejido que, por lo general, no contienen áreas con quistes o líquidas. Los diferentes tipos de tumores sólidos cancerosos reciben su nombre por el tipo de células que los forman. Los sarcomas (fibrosarcoma, osteosarcoma, Ewing, Kaposi, etc.), y los carcinomas (colon, mama, pulmón, pancreático, renal, cabeza y cuello, adenocarcinoma, carcinoma basocelular, etc.) son ejemplos de tumores sólidos cancerosos. Preferiblemente el tumor sólido canceroso se selecciona de la lista que consiste en cáncer de colon, prostático, mamario, pulmonar, dérmico, hepático, óseo, pancreático, ovárico, testicular, de

la vejiga, renal, cerebral, de cabeza o de cuello. Más preferiblemente el tumor sólido canceroso es cáncer mamario o un melanoma.

5 A los efectos de la presente invención, la expresión "tratamiento sistémico" o "administración sistémica" hace referencia a la aplicación de la granulicina de forma que viaje por la corriente sanguínea y llegue hasta las células de todo el cuerpo ejerciendo su acción en el tratamiento de tumores.

10 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede querer decir "uno" pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para querer decir "y/o" a menos que se indique explícitamente para referirse a alternativas solo o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y **15** "y/o". En toda esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, empleándose el procedimiento para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

20 Como se usa en esta memoria descriptiva y reivindicaciones, las palabras "comprender" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "comprende"), "tener" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "tiene"), "incluir" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluye" y "incluyen") o "contener" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas del procedimiento no citados, adicionales. El término "comprende" engloba y específicamente describe **25** "consiste esencialmente en" y "consiste en". Como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la invención reivindicada. Como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o **30** ingrediente no especificado en la reivindicación excepto, por ejemplo, impurezas habitualmente asociadas con el elemento o la limitación.

35 El término "o combinaciones de los mismos" como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los puntos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" se pretende que incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto

particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más puntos o términos, tales como BBB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la técnica entenderá que típicamente no existe un límite sobre el número de puntos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente de otro modo a partir del contexto.

Como se usa en el presente documento, palabras de aproximación tales como, sin limitación, "sobre", "alrededor de", "aproximadamente" se refieren a una condición que, cuando se modifica así, se entiende que no es necesariamente absoluta o perfecta sino que se consideraría lo suficientemente próxima para los expertos en la técnica para garantizar la designación de la condición como presente. La medida en que puede variar la descripción dependerá de lo grande que se pueda instituir un cambio y todavía reconozca un experto en la técnica que el rasgo característico modificado todavía tenga las características y capacidades requeridas del rasgo característico no modificado. En general, pero sujeto al análisis precedente, un valor numérico en el presente documento que se modifica por un palabra de aproximación tal como "aproximadamente" puede variar desde el valor establecido en $\pm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12$ o 15% , o menos, preferiblemente representa el valor establecido ($\pm 0\%$).

20

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Estructura de la GRNLY (9 kDa). Las hélices α están numeradas con números romanos (imagen de la izquierda). En la imagen de la derecha se muestra el potencial electrostático de la superficie molecular en la misma orientación que en la imagen de la izquierda (potencial positivo en azul y potencial negativo en rojo) [Kolter, T., et al., J Biol Chem, 2005. 280(50): p. 41125-8].

FIGURA 2. Mapa de pPICZ α C.

FIGURA 3. Tinción con azul de coomassie de un gel de acrilamida al 12% de los sobrenadantes obtenidos en la prueba de expresión a pequeña escala de A) GRNLY, donde el control positivo (GalNacT2WT) es una proteína recombinante que se expresa bien en *P. pastoris* y B) Quimera.

FIGURA 4. Tinción con azul de coomassie de un gel de acrilamida al 12% de la prueba de expresión a pequeña escala a diferentes condiciones de pH y temperatura de A) la colonia 2 transformada con pPICZ α C-GRNLY y B) la colonia 8 transformada con pPICZ α C-Quimera.

5 FIGURA 5. Diferentes fases de purificación del sobrenadante de *P. Pastoris* transfectada con pPICZ α MFE23-GRNLY, en las que se incluye el sobrenadante filtrado, permeado y concentrado resultantes tras concentrar con Pellicom, dializado, sobrenadante del dializado tras añadir la resina y centrifugar y sobrenadante de los lavados que se realizan a la resina. También se incluye la unificación de las fracciones de elución obtenidas mediante cromatografía de afinidad. A) Tinción con Azul de Coomassie de un gel de acrilamida al 12%
10 B) Inmunoblot con anticuerpo policlonal anti-GRNLY.

FIGURA 6. Fracciones de elución (se distinguen A y B porque provienen de diferentes columnas) y eluido unificado obtenidos en la purificación, tras la cromatografía de afinidad, de la quimera. A) Tinción con Azul de Coomassie de un gel de acrilamida al 12% B)
15 Inmunoblot con anticuerpo policlonal anti-GRNLY.

FIGURA 7. ELISA realizado con 200 ng de CEA por pocillo (se dejó toda la noche a 4 °C), después se añadió PBS (control negativo), 500 ng del scFv MFE23 recombinante (control
20 positivo) y el sobrenadante de *P. pastoris* transformada con pPICZ α C-Quimera tras inducir la expresión con metanol. Para revelar la unión de los scFvs al antígeno CEA, se usó un anticuerpo anti-cola de histidinas y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. El sustrato de la peroxidasa fue OPD, que produce un producto amarillo-naranja detectable a 492 nm.

25 FIGURA 8. Histogramas obtenidos tras analizar mediante citometría de flujo la unión de la quimera al antígeno CEA: A) experimento sobre células Jurkat y B) experimento sobre células HT29. Los histogramas tienen diferentes colores y corresponden a la fluorescencia detectada en las células sin marcaje (rojo), sólo con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (azul), con la quimera y anti-IgG de ratón (naranja), con anti-cola de histidinas y anti-IgG de ratón (verde claro) o con la quimera, anti-cola de histidinas y anti-IgG de ratón (verde oscuro).

FIGURA 9. Imagen de microscopía de fluorescencia de células HT29 con tinción Hoechst
35 33342 (fluorescencia azul) y con la quimera y anticuerpo secundario marcado con FITC (fluorescencia verde) A) incubadas con anticuerpos anti-cola de histidinas y anti-IgG de

ratón marcado con FITC y B) incubadas con la quimera y anticuerpos anti-cola de histidinas y anti-IgG de ratón marcado con FITC.

FIGURA 10. Experimento de citotoxicidad de la quimera sobre células Jurkat añadiendo diferentes concentraciones de ésta. Como control negativo se utilizó un volumen de PBS equivalente al añadido de la quimera. Además, otro control fue añadir al pocillo solo las células en medio de cultivo RPMI. Mediante citometría de flujo se miden el porcentaje de células anexina positivas tras 24 horas de incubación. Los resultados son la media \pm SD de dos experimentos diferentes.

10

FIGURA 11. Experimento de citotoxicidad de la GRNLY y la quimera sobre células HT29 añadiendo diferentes concentraciones. Tras 24 horas de incubación se realizó el contaje celular para determinar el porcentaje de crecimiento de las células a las que se le ha añadido GNLY o quimera con respecto a los controles. Como control en cada caso, se utilizó un volumen de PBS equivalente al añadido de la GRNLY o quimera.

15

FIGURA 12. Diagramas de citometría de flujo de células HT29 tratadas con diferentes concentraciones de quimera, según se indica, tras 24 horas de incubación. Tras la incubación, las células se marcaron con Anexina-V conjugada con Alexa-46 y con 7AAD y se analizaron mediante citometría de flujo. Los números que aparecen en los diagramas corresponden al porcentaje de células en cada cuadrante.

20

FIGURA 13. Se muestran resultados *in vivo* en un modelo de desarrollo tumoral de células HeLa-CEA en ratones atímicos y se observa que si se compara el grupo control con grupo MFE (quimera), hay diferencias significativas a partir de la 7^a inyección, siendo la diferencia muy significativa en las últimas inyecciones. Se observa como el crecimiento del tumor en los ratones tratados está de alguna manera retenido o atenuado. En el eje de la X se muestra los tratamientos (inyecciones) y en el eje de la Y se muestra el volumen del tumor (mm³).

30

FIGURA 14. Se muestran resultados *in vivo* y se observa que si se compara el grupo control con grupo Granulisina (no quimérica), no hay diferencias significativas, aunque la curva de la granulisina va por debajo de la curva control en todos los puntos. En el eje de la X se muestra los tratamientos (inyecciones) y en el eje de la Y se muestra el volumen del tumor (mm³).

35

FIGURA 15. Se muestran resultados *in vivo* y se observa el conjunto de las curvas mostradas en la Figura 13 y Figura 14. En el eje de la X se muestra los tratamientos (inyecciones) y en el eje de la Y se muestra el volumen del tumor (mm^3).

5 FIGURA 16. Se muestran resultados *in vivo* y se observan las medias \pm SD de los tamaños de los tumores una vez extraídos y sometidos a los diferentes tratamientos. En el eje de la Y se muestra los tamaños de los tumores una vez extraídos (mm^3).

FIGURA 17. Se muestran resultados *in vivo* y se observan las medias \pm SD de los pesos de los tumores una vez extraídos y sometidos a los diferentes tratamientos. En el eje de la Y se muestra el peso de los tumores una vez extraídos (gr).

10

FIGURA 18. Se muestran resultados *in vivo* y se observan los resultados en forma de curva Kaplan-Meier. Se muestra el tiempo que le cuesta a cada ratón en alcanzar un tamaño tumoral de 800 mm^3 en las tres condiciones experimentales.

15

FIGURA 19. Se muestran resultados *in vivo* y se observa la curva control y la de MFE, para poder calcular la significación estadística, que da una P de 0.027.

20 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: MATERIALES Y MÉTODOS

25

CULTIVOS CELULARES

Líneas celulares. Se emplearon las siguientes líneas celulares de origen humano:

- 30**
1. Jurkat, línea celular de Leucemia Linfoblástica Aguda de células T, clon E6-1, negativa para la expresión de CEA y positiva para la expresión de Tn.
 2. HT-29, línea celular de adenocarcinoma de colon, positiva para la expresión de CEA.
 3. HeLa-CEA, línea celular de cáncer de cérvix transfectada con una construcción de cDNA que codifica CEA, y que expresa en consecuencia niveles elevados de este

antígeno. La transfección se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Laura Sanz, Hospital Puerta de Hierro, Madrid.

4. MDA-MB-231, línea celular de adenocarcinoma de mama, negativa para la expresión de Tn..
5. MCF-7, línea celular metastásica de adenocarcinoma de mama, positiva para la expresión de Tn
6. Capan-2, línea celular de carcinoma pancreático, positiva para la expresión de Tn. Todas las líneas celulares se obtuvieron originalmente de la American Type Culture Collection (ATCC, USA),

10 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Las células se incubaron en un incubador termostatzado a 37°C en aire húmedo y con 5% de CO₂. Los frascos de cultivo con tapón de filtro, las pipetas y todo material para el efecto se usó en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UNIZAR.

15

Las células jurkat fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomicina y GlutaMAX 2mM. El cultivo se mantuvo con una densidad de hasta un millón de células por ml; lo que corresponde a un pase cada 3 ó 4 días.

20

El resto de líneas celulares fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Catalog No. 30-2002. El mismo se suplementó con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100ug/ml de estreptomicina y GlutaMAX 2mM. Para los pases se tomó en cuenta las recomendaciones de la ATCC sobre la concentración de las células en el medio, esto es aproximadamente un millón de células por ml previa tripzización y los ratios de subcultivos dependiendo de cada tipo celular, así las CAPAN-2 requirieron ratios de 1:2 a 1:4, las MIA PACA-2 ratios 1:3 a 1:8, etc. Se usó estas consideraciones para expandir las células para los ensayos in vivo.

30

Así mismo, según recomendaciones de la ATCC, la criopreservación de las líneas celulares se hizo en SFB 95% y dimetilsulfóxido (DMSO) 5% a una densidad celular de 5 x 10⁶/ml. En primera instancia se congeló durante 24 a 48 horas en un congelador a -86°C y luego se trasladó a un contenedor de nitrógeno líquido.

35

Para el proceso de descongelación de las células se procedió a realizar un lavado con 10 ml de medio de cultivo y posteriormente sembrar las células a una densidad doble de la que se empleó para los pases.

5 CONTAJE Y VIABILIDAD CELULAR

La determinación de viabilidad celular se hizo mediante una solución al 0,4% de azul de tripán en 0,15M de NaCl (Sigma, Madrid), este colorante es capaz de ingresar al citoplasma de las células con pérdida de integridad de la membrana celular. Luego de mezclar el colorante con la suspensión de células (50ul de cada uno), se procedió al conteo en una cámara de Neubauer (hemocitómetro) y observó al microscopio (Optiphot, Nikon). La fórmula usada para calcular la densidad celular es la siguiente:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total Células Contadas} \times 10.000}{\text{Número de Cuadrados}}$$

De esta fórmula se calculó el porcentaje de viabilidad celular para proceder a realizar los ensayos siempre con una viabilidad superior a 90%.

CLONAJE DE QUIMERAS Anti-Tn

Material Genético de inicio: se usó el plásmido integrativo pPICZ α , las características de este constructo son las siguientes:

- pUC ori: permite la replicación del plásmido en de *E. coli*
- Promotor AOX1: se induce por metanol y dirige la integración del plásmido en el locus AOX1 de *Pichia* mediante recombinación homóloga.
- Factor α : permite la secreción eficiente de proteínas
- Sitio de clonaje múltiple: permite la inserción de DNA en el vector de expresión
- Epítipo c-myc: permite la detección con anticuerpo anti-myc
- Cola de polihistidinas: facilita la purificación de la proteína recombinante
- Terminador de la transcripción AOX1: incrementa la estabilidad del mRNA permitiendo un eficiente procesamiento del extremo 3' del mRNA, incluyendo poliadenilación

- Gen de resistencia a zeocina (antibiótico de amplio espectro): sirve como marcador de selección. Se encuentra precedido por los promotores *TEF1* y EM7 y seguido del terminador de la transcripción *CYC1*

5 El cDNA de la GRNLY humana y el cDNA de SM3 y Ar20.5 conjugados con GRNLY humana se integran direccionalmente entre los sitios de corte de enzimas de restricción Cla I y Xba I que se encuentran en el sitio de clonaje múltiple de pPICZαC y pPICZαA, dentro del marco de lectura.

10 El plásmido pPICZαC-GRNLY fue sintetizado por la Dra. Laura Sanz (Hospital Puerta de Hierro, Madrid) a partir de la secuencia de DNA de GRNLY humana cedida a nuestro grupo por el Dr. Alan Krensky (Northwestern University, Chicago). Respecto a los plásmidos pPICZαA-SM3 13^o y pPICZαA-Ar20.5; fueron cedidos por el Dr. Ramón Hurtado (Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos BIFI de la Universidad de Zaragoza).

PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS COMPETENTES

15 *E. coli* DH5α se hizo “competente” para transformación mediante la apertura de los poros en la membrana con CaCl₂ a baja temperatura. El procedimiento consistió en sembrar *E. coli* DH5α en un tubo de 50ml con 10ml de medio LB líquido en agitación (180rpm) a 37°C toda la noche. De ese producto se usó 200ul para diluir en 20ml de medio LB fresco y repetir la incubación hasta alcanzar una absorbancia de aproximadamente 0.3-0.4 a 600nm, que equivale a una concentración de 5-10 x 10⁷ bacterias/ml). Seguidamente se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó 8 minutos a 4°C y 8000xg. Se lavó una vez con agua estéril, se incubaron en 10ml de CaCl₂ 50mM frío por 15 minutos y se volvió a centrifugar 8 minutos a 3000xg. Finalmente, se resuspendió el decantado en 4ml de una solución de CaCl₂ 50mM con 15% de glicerol y se congeló a -80°C hasta su utilización.

25

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA Y EXPANSIÓN

30 La transformación de *E. coli* DH5α competentes con pPICZαC-Ar20.5-GRNLY o pPICZαC-SM3-GRNLY se hizo por choque térmico. Se descongeló dos alícuotas de aproximadamente 200ul incubándolas en hielo y en cada una se añadieron (estos procedimientos se realizaron flameando bajo llama) 50ng de ADN plasmídico por 20 minutos, se introdujo en un baño a 42°C por un minuto y medio y dos minutos en hielo nuevamente. Fue añadido 1ml de medio líquido LB en cada alícuota y se incubó a 37°C con agitación 200rpm por dos horas. A continuación, se sembró las bacterias transformadas en medio LB sólido (1,5%) con zeocina (25 µg/ml) a 37°C toda la noche, de forma que crecieron las bacterias que incorporaron el

plásmido. De las colonias que se desarrollaron, se seleccionó al azar cuatro para cada proteína, se cultivaron en tubos de 50ml con 10ml de medio líquido LB y 25ug/ml de zeocina (una colonia por tubo) en agitación a 180rpm a 37°C toda la noche.

5 SELECCIÓN DE BACTERIAS CON MAYOR NIVEL DE EXPRESIÓN DE GRANULISINA

Se aisló el plásmido mediante minipreparación con el kit “Nucleospin® Plasmid Easypure”. Para comprobar si se aislaron los plásmidos con el peso molecular adecuado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, compuesto por 0,3 g de agarosa (Scharlau), 30 ml de tampón TAE 1x (tampón de Tris-Acetato de EDTA, Invitrogen pH 8,3) y para teñir el DNA, 3 µl de SYBR® Safe (Invitrogen). La visualización de los geles se realizó en un Gel Doc 2000 transiluminador (BioRad). Para expandir los plásmidos en mayor cantidad, se cultivaron las colonias transformadas de E. Coli en medio LB con zeocina (25 µg/ml) utilizando el kit “Quantum Prep™ Plasmid Midiprep”. En ambos casos, mediante un aparato NanoDrop® (NanoVue) se determinó la concentración y pureza de los plásmidos obtenidos.

15

MATERIAL GENÉTICO DE PARTIDA: pPICZ α C-GRNLY y pPICZ α C-QUIMERA

pPICZ α C es un plásmido integrativo de origen comercial [*pPICZ α A, B, and C: Pichia expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins, MAN0000035, Invitrogen, Corporate Headquarters, Rev. Date: 7/7/2010*] que contiene, como se muestra en la **Figura 2**, las siguientes características:

20

- pUC ori: permite la replicación del plásmido dentro de *E. coli*
- Promotor AOX1: se induce por metanol y dirige la integración del plásmido en el locus AOX1 de *Pichia* por recombinación homóloga.
- Factor α : permite la secreción eficiente de proteínas
- Sitio de clonaje múltiple: permite la inserción de DNA en el vector de expresión
- Epítipo c-myc: permite la detección con anticuerpo anti-myc
- Cola de polihistidinas: permite purificar la proteína recombinante con mayor facilidad
- Terminador de la transcripción AOX1: incrementa la estabilidad del mRNA permitiendo un eficiente procesamiento del extremo 3' del mRNA, incluyendo poliadenilación

30

- Gen de resistencia a zeocina (antibiótico de amplio espectro): sirve como marcador de selección. Se encuentra precedido por los promotores *TEF1* y *EM7* y seguido del terminador de la transcripción *CYC1*.

El cDNA de la GRNLY humana y el cDNA del MFE23 unido a GRNLY humana se integran direccionalmente entre los sitios de corte de enzimas de restricción Cla I y Xba I que se encuentran en el sitio de clonaje múltiple de pPICZαC (encuadradas en la **Figura 2**), dentro del marco de lectura. La secuencia de cDNA de granulicina humana (SEQ IDNo.1) fue amablemente cedida a nuestro grupo por amablemente cedido por el Dr. Alan Krensky (Northwestern University, Chicago).

ESQUEMA Y PARÁMETROS DE LA QUIMERA

10

De manera genérica, la proteína de fusión obtenida tiene el siguiente esquema:

MFE23-LINKER-GRANULISINA (9 kDa)-COLA DE HISTIDINAS

15

TABLA 1: Parámetros de la quimera obtenidos con la herramienta ProtParam (Expasy) a partir de sus aminoácidos

QUIMERA (MFE23-GRNLY)				
Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	pl teórico	Coefficiente de extinción a 280 nm ($M^{-1} cm^{-1}$) asumiendo que todos los pares de Cys forman puentes disulfuro	Coefficiente de extinción a 280 nm ($M^{-1} cm^{-1}$) asumiendo que todos los residuos de Cys están reducidos
347	37,1069	9,03	62840	62340

TRANSFECCIÓN DE *Pichia pastoris* MEDIANTE ELECTROPORACIÓN

20 Es necesario que los plásmidos queden de forma lineal para que se integren con más facilidad en el genoma de *Pichia pastoris*. Para ello, se realiza una digestión con la enzima SacI, la cual tiene un sitio de corte único dentro de pPICZαC y no corta dentro de los insertos que se quieren introducir. Seguidamente, para comprobar que el plásmido se ha digerido correctamente, se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Tras

25 comprobar que la digestión ha ido bien, se realiza la limpieza de restos de la digestión (sales y gel de agarosa residual) y se purifica el plásmido utilizando el kit "AccuPrep® Gel Purification".

- Son necesarios los tratamientos previos descritos en el manual [*Pichia Expression Kit, Invitrogen, Rev. Date: 10/1/2014*], primero con una solución 100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0,6 M sorbitol y 10 mM Tris-HCL, pH 7.5 y después con otra solución de sorbitol 1 M, antes de proceder a la electroporación de *Pichia pastoris* SMD1168 con los plásmidos. Se utiliza el
- 5** electroporador (MicroPulser™ de BIORAD) en el programa para electroporar *Pichia*. Además, se plaquean las células de *Pichia pastoris* SMD1168 electroporadas en ausencia y presencia del plásmido linealizado en placas conteniendo zeocina (las células que no contienen el plásmido no deberían crecer en placas con zeocina y, por consiguiente, este hecho indica que la electroporación ha ido bien) y se dejan las placas en la estufa a 30 °C
- 10** durante todo el proceso de electroporación a modo de control. Las colonias transfectadas se seleccionan plaqueándolas en una placa de YPDS (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 2% dextrosa, 182,2 g/L de sorbitol, pH 6) con zeocina (200 µg/ml) y se incuban las placas 3-10 días a 30°C hasta que aparezcan colonias. Finalmente, se eligen algunas colonias bien aisladas que hayan crecido en la placa con zeocina y se replaquean en una
- 15** placa nueva, para más adelante elegir la mejor cepa.

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CULTIVOS DE *Pichia pastoris*

- Se inoculan colonias seleccionadas en medio BMGY (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 100 mM tampón fosfato pH6, 13.4 g/L base de levadura nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 1ml/L glicerol y 0,4mg/L de biotina) cultivándose a 30 °C
- 20** durante un día para que crezca la levadura. Después, se realiza un cambio de medio a BMMY (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 100 mM tampón acetato de sodio pH5, 13.4 g/L base de levadura nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 0,5 ml/L metanol y 0,4mg/L de biotina), manteniendo el cultivo a 18 °C en agitación durante un día
- 25** para que empiece la inducción de la expresión de la proteína recombinante. A partir del primer día de inducción y cada 24 horas durante 2 días más se añade metanol a una concentración final de 1% en el medio de cultivo y se deja hasta el día siguiente a 18 °C en agitación. Primero se realizó una producción a pequeña escala de las colonias seleccionadas. Una vez escogidas las colonias que más proteína recombinante producían,
- 30** se probaron diferentes condiciones de pH y temperatura para averiguar las condiciones óptimas de producción. Finalmente, se realizó la producción de proteínas recombinantes a una mayor escala.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

El sobrenadante de las levaduras se filtra mediante un sistema de filtración por vacío primero con un filtro de 0,45 µm y luego con un filtro de 0,22 µm. Seguidamente se concentra en un concentrador Pellicon XL Ultracel 5 kDa 0,005 m² (Millipore) desde 1 L hasta aproximadamente 50 ml. A continuación, en el caso de la quimera, se realiza una diálisis utilizando una tripa de diálisis (Millipore) y, en el caso de la GRNLY recombinante, se realiza una diálisis utilizando un “Cassette de diálisis Slide-A-Lyzer™” (Thermo Scientific Pierce) con una membrana de tamaño de poro de 3,5 kDa, debido a su pequeño peso molecular. La tripa de diálisis o la membrana se sumergen en 5L de tampón de lavado (300 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl y 20 mM de imidazol pH 7,4) y se dejan dializando toda la noche. Se realiza diálisis para cambiar el medio procedente del sobrenadante de levaduras en el que se encuentra la GRNLY por el tampón que se va a utilizar más adelante en la cromatografía de afinidad con níquel. El imidazol se encuentra en el tampón en baja concentración, de forma que compite con las moléculas que se unen inespecíficamente a la columna de níquel.

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La GRNLY y quimera recombinantes se expresan con una cola de histidinas con el fin de purificarlas mediante una cromatografía de afinidad a níquel, ya que los anillos de imidazol de las histidinas poseen una alta afinidad por el catión Ni²⁺.

Para ello, la resina de Ni-NTA agarosa (Qiagen) se mezcla con tampón de lavado (300 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl y 20 mM de imidazol pH 7,4), se centrifuga a 2500 rpm durante 2 minutos y se elimina el sobrenadante. Seguidamente se añade tampón de lavado y se vuelve a centrifugar a 2500 rpm durante 2 minutos para eliminar el sobrenadante. Después se resuspende la resina en tampón de lavado y se mezcla con la solución resultante tras la diálisis. Después se coloca en una noria en rotación a 4 °C durante 1 hora y media aproximadamente. A continuación, se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos. El precipitado se lava tres veces con tampón de lavado, se pone en rotación en una noria 15 minutos y se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos. El precipitado se coloca en una columna con tampón de lavado, y se deja que la resina se pose. La columna se eluye con tampón de elución (500 mM de imidazol, 300 mM de NaCl y 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4). Seguidamente, se cuantifica la cantidad de proteína en las fracciones eluidas procedentes de la cromatografía de afinidad mediante un aparato NanoDrop® (NanoVue). Después, se unifican las fracciones de elución que contengan una cantidad de proteína aceptable.

CAMBIO DE TAMPÓN Y CONCENTRACIÓN

Para cambiar el tampón de elución por PBS se pasa la quimera en tampón de elución por una columna con Sephadex G-25 (Thermo-Fisher) previamente equilibrada con PBS y se concentra con Amicon de tamaño de poro de membrana de 15 kDa (Millipore) o directamente se cambia el tampón y se concentra con dicho Amicon. En el caso de la GRNLY recombinante, se cambia el tampón y concentra la elución a la vez mediante un Amicon de tamaño de poro de membrana de 3 kDa. Finalmente, con un aparato NanoDrop® (NanoVue) se mide la concentración de proteína en el concentrado final y se esteriliza por filtración, a través de un filtro de 0,22 µm.

TINCIÓN COOMASIE E INMUNOBLOT

Para realizar la prueba de expresión se hace una electroforesis desnaturalizante en gel de acrilamida al 12% compuesto por dos tipos de geles de la misma composición pero en distinta proporción (gel concentrador, o “stacking gel” y gel separador o “resolving gel”), cargando el sobrenadante obtenido de cada colonia junto con un marcador de peso molecular. Seguidamente, se tiñeron dichos geles con Azul Coomassie para averiguar que colonia producía más cantidad de proteína recombinante.

Además, en todos los pasos de la purificación se van guardando alícuotas a 4 °C para poder analizarlas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de las diferentes alícuotas y se realiza una tinción con Azul Coomassie y un inmunoblot transfiriendo las proteínas separadas en el gel a membranas de nitrocelulosa de acuerdo con el método descrito previamente [Anel, A., et.al., J Biol Chem, 1993. 268(23): p. 17578-87] e incubando la membrana con un anticuerpo primario policlonal de conejo, amablemente cedido por la Dra. Carol Clayberger (Northwestern University, Chicago). A continuación, tras el lavado, se añade anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma). Más adelante, se lava con tampón B (PBS con 0.05 % de Tween-20, pH 7.4) en agitación para eliminar el exceso de anticuerpos.

La detección de los complejos se lleva a cabo mediante revelado por quimioluminiscencia (ECL). Esta técnica se basa en la detección de la luz emitida por la oxidación de luminol, un sustrato quimioluminiscente, por parte de la peroxidasa. Esta luz se capta por películas fotográficas (High performance chemiluminescence film, GE HealthCare) en oscuridad y previa incubación de las membranas con “Pierce ® ECL Western Blotting Substrate” (Thermo Scientific). La exposición de las películas se lleva a cabo dentro de un cassette de revelado radiológico (Hypercassette™, Amersham Bioscience) y en un cuarto oscuro con iluminación adecuada para revelado fotográfico. Las películas se revelan, tras la exposición, mediante inmersión en soluciones de revelador-agua destilada-fijador, variando el tiempo de solución de revelador según la señal obtenida.

ENSAYO DE ESPECIFICIDAD

- Se realizó un ELISA utilizando 200 ng de CEA por pocillo, que se incubó toda la noche a 4 °C, después se añadió PBS (control negativo), 500 ng del scFv MFE23 recombinante (control positivo) y el sobrenadante de *P. pastoris* transformada con pPICZαC-Quimera tras
- 5** inducir la expresión con metanol. Para revelar la unión de los scFvs al antígeno CEA, se usó un anticuerpo anti-cola de histidinas y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. El sustrato de la peroxidasa fue OPD, que produce un producto amarillo-naranja detectable a 492 nm.

CITOMETRIA DE FLUJO

- 10** Con el fin de estudiar la unión de la quimera al antígeno CEA se realizó un experimento con células HT29 (ATCC), las cuales expresan en superficie el antígeno CEA y, como control negativo, con células Jurkat, (ATCC) las cuales no expresan en superficie el antígeno CEA. Estas células se depositaron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración de 100.000 células por pocillo, se lavaron con PBS con 5% de SFB y se
- 15** añadió quimera (10 µg/ml). Tras incubar 1 hora a 4 °C y lavar con PBS con 5% de SFB, se marcaron con anticuerpo murino anti-HIS (1:200) y, tras incubar otra hora a 4 °C, se añadió anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a FITC (1:200). Finalmente se incubó otra hora a 4 °C y se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo. De esta forma, si la quimera se une a la superficie de las células se observa fluorescencia. Se llevaron a cabo diversos
- 20** controles negativos, en ausencia de quimera y/o anticuerpos, para asegurarnos que la unión de la quimera a CEA es específica.

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

- Además, se realizó el mismo proceso sobre un cubre en una placa de 24 pocillos con
- 25** células HT29, quimera y anticuerpos anti-His y anti-IgG de ratón conjugado con FITC, tras el cual se realizó la tinción Hoechst 33342 para poder visualizar los núcleos celulares y analizar mediante microscopía de fluorescencia.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

- 30** La citotoxicidad de la GRNLY o de la quimera se ensayó sobre la leucemia aguda de tipo T Jurkat, que es el estándar de sensibilidad a la GRNLY en nuestro laboratorio, y sobre el carcinoma de colon humano HT29. Las células Jurkat crecen en suspensión en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco®) suplementado con un 5% de suero fetal bovino

decomplementado, glutamina y antibióticos y no expresan el antígeno CEA. Las células HT29 son células adherentes que crecen en el medio de cultivo DMEM (Gibco®) suplementado de la misma manera y expresan el antígeno CEA en su superficie. Las células adherentes necesitan ser tripsinizadas para su manejo y resiembra. En las muestras control se añade un volumen equivalente de PBS sobre las células que el añadido de la GRNLY o de la quimera. En el caso de la línea celular Jurkat se añaden células a una concentración de 30000 células por pocillo, el PBS o la quimera/ GRNLY; se siembran en placas de 96 pocillos y se incuban a 37 °C con 5% de CO2 durante 24 horas. En el caso de la línea celular HT29, se siembran primero sólo las células a una concentración de 30000 células por pocillo en medio de cultivo DMEM y se incuban durante 24 horas a 37 °C en un incubador con 5% de CO2 para que las células se adhieran, y, una vez adheridas, se añade la quimera o el PBS y se incuban a 37 °C durante 24 horas más.

Una característica importante del fenotipo apoptótico es la exposición de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática [Martin, S.J., et al., J Exp Med, 1995. 182(5): p. 1545-56]. Para medir esta translocación, se puede utilizar la anexina V, una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina. En estadios tardíos de apoptosis, cuando la membrana plasmática ha perdido su integridad y el DNA se hace accesible, se emplean fluoróforos que actúan como agentes intercalantes en los ácidos nucleicos de doble cadena como la 7-AAD. En estos experimentos, se incuban las células con anexina V conjugada con el fluoróforo Alexa-46, (Immunostep) y con 7AAD (Immunostep) en el caso de las células HT29, en tampón ABB 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM Hepes(NaOH, pH 7,4, durante 15 minutos en la oscuridad. De esta forma, mediante citometría de flujo se puede cuantificar el porcentaje de células apoptóticas en cada una de las condiciones del ensayo.

La citotoxicidad de GRNLY no se había ensayado aún sobre las células HT29, de modo que se ensayaron tanto la citotoxicidad de la GRNLY como de la quimera mediante la tinción con azul tripán. El azul tripán es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a solo a tejidos y células muertas, ya que no es capaz de atravesar las membranas intactas de células vivas. Se utilizó un microscopio y una cámara de Neubauer para el conteo celular. Tras el conteo, se comparó el número de células de cada pocillo con respecto al pocillo control, el cual sólo contenía células y medio de cultivo. De esta forma se obtuvo el porcentaje de crecimiento con respecto al control.

EJEMPLO 2: PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CULTIVOS DE *Pichia pastoris*

Tras la transfección de *Pichia pastoris* y cultivo cómo se indica en materiales y métodos, se consiguió expresar y secretar al medio, gracias al factor- α , proteína recombinante con éxito.

5 En la **Figura 3A** se puede apreciar en todas las colonias escogidas e inducidas una banda correspondiente a un peso molecular cercano a 11 kDa, que se corresponde con el peso de la GRNLY recombinante, ya que la GRNLY tiene un peso de aproximadamente 9 kDa, pero al estar fusionada a una cola de histidinas su peso molecular asciende aproximadamente hasta 11 kDa. En realidad se aprecian al menos dos bandas con pesos moleculares muy

10 similares pertenecientes a diferentes isoformas de la GRNLY recombinante. Esto es debido a que la GRNLY sufre modificaciones postraduccionales de O-glicosilación. Observaciones similares se habían hecho previamente por otro grupo de investigación que realizó un trabajo similar en el que se determinó que las diferentes bandas obtenidas eran debidas a la O-glicosilación [Guo, Y., et al., Appl Microbiol Biotechnol, 2013. 97(17): p. 7669-77].

15 También, en la **Figura 3B** se puede apreciar en todas las colonias escogidas e inducidas una banda correspondiente a un peso molecular cercano a 35 kDa que se corresponde con el peso de la GRNLY unida a MFE23 recombinante (**Figura 3B**). A la vista de estos resultados (**Figura 3**), se decidió hacer la expresión a mayor escala con la colonia 8

20 transformada con pPICZ α C-Quimera y con la colonia 2 transformada con pPICZ α C-GRNLY. Otro grupo ha descrito la producción de GRNLY recombinante a gran escala gracias a un fermentador y obtuvo mejores resultados de expresión cuando indujo a pH 5 y a 30 °C [Guo, Y., et al., Appl Microbiol Biotechnol, 2013. 97(17): p. 7669-77]. En consecuencia, se realizó una prueba de expresión en la que se indujo a diferentes condiciones de pH y temperatura

25 para comprobar en qué condiciones se expresaban mejor nuestras proteínas. En ambos casos, los mejores resultados se consiguieron induciendo a pH 5 y 18 °C (**Figura 9**). Al inducir a 30 °C y pH 5 se expresan muchas proteínas de *Pichia pastoris*, además de la GRNLY, lo cual no interesa, ya que puede dificultar la pureza de la proteína durante la purificación (Figura 4A).

30

EJEMPLO 3: PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

En la **Figura 5** se muestran los pasos de una de las purificaciones que se llevaron a cabo sobre la quimera. En el caso de la GRNLY, este proceso fue mostrado en un trabajo anterior [Ibáñez, R., Universidad de Zaragoza. 2015]. En la **Figura 5A**, se puede apreciar que el sobrenadante de *P. Pastoris* obtenido tras la inducción (calle 1) contiene proteínas bastante

35

diluidas. Tras concentrarlo con Pellicom, en el permeado (calle 3) no se aprecian bandas de proteínas, pero en el concentrado (calle 2) se encuentran las proteínas mucho más concentradas que en el sobrenadante. Tras dializar (calle 4), el perfil de bandas se mantiene similar al concentrado. Además, en el tampón en el que se introdujo la tripa de diálisis (calle 5) no se aprecian bandas de proteínas. Al añadir la resina de níquel, la quimera se une a ésta debido a que tiene una cola de histidinas. Tras añadir la resina (calle 6), disminuye la intensidad de una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 40 kDa con respecto al concentrado y dializado. Esta banda podría corresponder a la quimera. El hecho de que esta banda no desaparezca del todo, podría indicar que la resina de níquel se saturó.

5 En los lavados realizados sobre la resina, sobre todo en el primero (calle 7), se aprecia cómo se eliminan restos de otras proteínas. Finalmente, tras la elución de la columna de níquel, se observa claramente una proteína mayoritaria con un peso molecular de alrededor de 40 kDa, correspondiente al de la quimera (calle 11). Como se muestra en la **Figura 5B**, se confirmó mediante inmunoblot que esta banda en torno a 40 kDa corresponde a la quimera (calle 11). También se confirma que la resina se saturó porque aparece una banda en la fase de dializado post-resina (calle 6).

10

15

En la **Figura 6** se muestran diferentes fracciones de elución y la unificación de todas ellas salvo la fracción de elución 1. En la **Figura 6A** se observan en las diferentes fracciones de elución y en el eluido total varias bandas. La banda de mayor intensidad tiene un peso molecular correspondiente a la quimera. Además, se observan otras bandas de pesos moleculares intermedios, lo cual significa que la quimera sufre una proteólisis parcial. La segunda banda de mayor intensidad tiene un peso molecular de alrededor de 10 kDa, el cual corresponde a la GRNLY de 9 kDa, ya que aumenta su peso molecular al estar unida a una cola de histidinas. En la **Figura 6B** se confirmó mediante inmunoblot que estas bandas en torno a 40 y 10 kDa corresponden a la proteína quimérica recombinante y a la GRNLY recombinante respectivamente.

20

25

Una vez generada la quimera, debemos asegurarnos de su funcionalidad, por un lado que el scFv sigue reconociendo el antígeno CEA y, por otro, que la GRNLY sigue siendo citotóxica.

30

EJEMPLO 4: ENSAYO DE ESPECIFICIDAD

ELISA

Parte del sobrenadante se utilizó para comprobar mediante ELISA que la quimera es capaz de unirse al antígeno CEA. El resultado fue que la quimera es capaz de unirse al antígeno CEA de forma similar al scFv MFE23 (**Figura 7**).

5 CITOMETRÍA DE FLUJO

Se llevó a cabo un experimento mediante citometría de flujo y detección de fluorescencia usando las células de carcinoma de colon HT29, que expresan CEA o, como control negativo, sobre las células de leucemia de tipo T Jurkat, que no lo expresan. Para llevar a cabo este análisis se añadió la quimera en frío sobre las células, seguida de un anticuerpo anti cola de histidinas hecho en ratón y de un anticuerpo anti-IgG de ratón unido a FITC. De esta forma, se observará marcaje fluorescente si la quimera se une a CEA expresado en la superficie de las células HT29. Se llevaron a cabo diversos controles negativos, en ausencia de quimera y/o anticuerpos, para asegurarnos que la unión de la quimera a CEA es específica.

Como se puede observar en la **Figura 8**, aunque se detecta un cierto aumento de fluorescencia en las células Jurkat cuando se añade la quimera y los dos anticuerpos (**Figura 8A**), este aumento es mucho menor que el que se observa cuando se realiza el mismo experimento sobre las células HT29 (**Figura 8B**). Los datos obtenidos en los controles parecen indicar que la combinación del anticuerpo anti-His con el anticuerpo anti-IgG de ratón produce un marcaje inespecífico que es mayor en el caso de las HT29 que en el de las células Jurkat (**Tabla 2**). Sin embargo, el marcaje específico en presencia de la quimera es en cualquier caso mayor en el caso de las células HT29.

TABLA 2: Intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida tras analizar mediante citometría de flujo la unión de la quimera al antígeno CEA

	MFI	
	JURKAT	HT29
Células	2.29	3.4
Células + α-mouse	2.46	3.4
Células + MFE23-GRNLY + α-mouse	2.46	4.22
Células + α-His + α-mouse	2.64	6.04
Células + MFE23-GRNLY + α-His + α-mouse	3.92	8.35

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Con el fin de ilustrar estos resultados, se realizó microscopía de fluorescencia, cuyos resultados se plasman en la **Figura 9**, donde se muestra la tinción de los núcleos de las células HT29 con la molécula fluorescente Hoechst 33342. En la **Figura 9B** se muestran los núcleos de las células rodeadas de un halo verde correspondiente al marcaje de CEA por parte de la quimera en la membrana plasmática de las células, mientras que en la **Figura 9A**, usada como control negativo, en la cual no se ha añadido la quimera no se aprecia dicho halo.

5

10 EJEMPLO 5: ENSAYO DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

Células de la línea celular Jurkat fueron tratadas con diferentes dosis de quimera. El resultado fue que la quimera es tóxica frente a células Jurkat de forma dosis dependiente como se puede apreciar en la **Figura 10**. Con una concentración de 6 μM de la quimera, prácticamente todas las células sufren muerte por apoptosis.

15

Células HT29 fueron tratadas con diferentes dosis de GRNLY y de quimera. El resultado fue que tanto la GRNLY como la quimera son tóxicas frente a células HT29 de forma dosis dependiente como se puede apreciar en la **Figura 11**. Concentraciones de 4 ó 5 μM de la GRNLY o de la quimera, parecen tener un efecto similar, pero la quimera es más citolítica que la GRNLY a una concentración de 6 μM , consiguiendo un porcentaje de crecimiento con respecto al control de un 30 %, es decir, una citotoxicidad del 70 %. Para igualar dicho efecto se tiene que usar una concentración de alrededor de 20 μM de GRNLY.

20

Además, también se realizaron marcajes con Anexina-V conjugada con Alexa-46, que muestra la exposición fosfatidilserina, y con 7AAD, que muestra la integridad de la membrana sobre células HT29 tratadas con diferentes concentraciones de quimera para analizar el tipo de muerte celular inducida. Al aumentar la concentración de quimera, se observa cómo se produce un aumento de células marcadas con anexina que todavía no han perdido la integridad de membrana, indicando que la muerte celular se produce por apoptosis (**Figura 12**). Además, se observa que se produce un aumento significativo de la

25

citotoxicidad al incubar las células con una concentración de 6 μM de quimera, de acuerdo con lo mostrado en el **Figura 16**. La dosis máxima de quimera utilizada fue de 6 μM , mientras que en el caso de la GRNLY se alcanzó una concentración de hasta 20 μM .

30

EJEMPLO 5: ENSAYO *IN VIVO* CON CÉLULAS HELA-CEA

Se ensayaron 5 ratones por grupo (grupo control, grupo con granulicina y grupo MFE (con la quimera). Aunque en el grupo MFE hubo un ratón que murió tras la sexta inyección, sin embargo, los otros 4 llegaron en buen estado hasta el final del experimento. El tumor se inyectó subcutáneo con Matrigel a 2 millones de células. Los tratamientos empezaron cuando los tumores habían llegado a 150 mm³ de tamaño. Los tratamientos fueron sistémicos, intraperitoneales y cada dos días (inyecciones):

- 5**
- Grupo control, 500 ul de PBS.
 - Grupo granulicina, 220 ul de un stock a 500 ug/ml (40 uM), es decir 110 ug por inyección, lo que da una concentración aproximada en 2 ml de sangre total de 5 uM.
 - Grupo MFE, 500 ul de stocks de alrededor de 900 ug/ml (25 uM), es decir 425 ug por inyección, lo que nos da una concentración aproximada en 2 ml de sangre total de 5 uM
- 10**
- 15**

Se hicieron 10 inyecciones y los ratones se sacrificaron 2 días después de la última inyección.

- 20** Los resultados se ilustran en las **Figuras 13 a 19**. En la **Figura 13** se observa que si se compara el grupo control con grupo MFE (quimera), hay diferencias significativas a partir de la 7^a inyección, siendo la diferencia muy significativa en las últimas inyecciones. Se observa como el crecimiento del tumor en los ratones tratados está de alguna manera retenido o atenuado. En la **Figura 14** se observa que si se compara el grupo control con grupo
- 25** Granulicina (no quimérica), no hay diferencias significativas, aunque la curva de la granulicina va por debajo de la curva control en todos los puntos. En la **Figura 15** se observa el conjunto de los resultados mostrados en la **Figura 13** y **Figura 14**. En la **Figura 16** se observan las medias \pm SD de los tamaños de los tumores una vez extraídos y sometidos a los diferentes tratamientos, mostrándose un tamaño menor de tumor con el
- 30** tratamiento con granulicina y aún más pequeño cuando se usa la quimera. En la **Figura 16** se observan las medias \pm SD de los pesos de los tumores una vez extraídos y sometidos a los diferentes tratamientos, mostrándose un peso menor de tumor con el tratamiento con granulicina y aún menor cuando se usa la quimera.

35

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido granulicina que comprende la secuencia SEQ ID NO:1 o una variante de la misma con al menos un 85% de identidad para ser usada en el tratamiento de tumores hematológicos o sólidos, caracterizada porque la granulicina se administra por vía sistémica.
5

2. Composición farmacéutica adaptada para ser administrada por vía sistémica que comprende una molécula que a su vez comprende:
10
 - a) un anticuerpo recombinante dirigido contra un antígeno tumoral, y
 - b) el polipéptido granulicina que comprende la secuencia SEQ ID NO:1 o una variante de la misma con al menos un 85% de identidad;
donde dicho anticuerpo recombinante y dicho polipéptido granulicina forman parte de una única cadena polipeptídica; y
15 donde dicho anticuerpo recombinante es un polipéptido monocatenario.

3. Composición farmacéutica, según la reivindicación 2, donde el anticuerpo recombinante está situado en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica y se encuentra físicamente unido, opcionalmente mediante un conector peptídico, al polipéptido granulicina, donde el polipéptido granulicina está opcionalmente unido a una secuencia de polihistidina.
20

4. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 donde dicho polipéptido granulicina consiste en la SEQ ID NO:1.
25

5. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde dicho anticuerpo recombinante es seleccionado entre un fragmento variable de cadena única (scFv) y un anticuerpo de dominio único (sdAb), preferiblemente dicho anticuerpo recombinante es un scFv.
30

6. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, donde dicho anticuerpo recombinante está dirigido frente a un antígeno tumoral característico de uno o más tipos de tumores hematológicos o sólidos.

7. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde dicho anticuerpo recombinante está dirigido frente al antígeno carcinoembriogénico (CEA).
- 5** 8. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde dicho anticuerpo recombinante consiste en el anti-CEA scFv MFE23 de SEQ ID NO: 2.
- 10** 9. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, donde dicho conector peptídico tiene una longitud de 5 a 40 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 30 aminoácidos, más preferiblemente de aproximadamente 20 aminoácidos.
- 15** 10. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, donde dicho conector peptídico comprende 2 o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Gly, Ser, Ala y Thr.
11. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que dicho conector peptídico comprende la secuencia SEQ ID NO: 3.
- 20** 12. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, donde dicho anticuerpo recombinante consiste en el anti-CEA scFv MFE23 de SEQ ID NO: 2, donde dicho polipéptido granulinsina consiste en la secuencia SEQ ID NO:1 y donde dicho conector peptídico consiste en la secuencia SEQ ID NO:3.
- 25** 13. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, donde dicha molécula comprende o consiste en el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 4.
- 30** 14. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, donde dicha molécula ha sido producida mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:
- a. introducción de un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 en una célula huésped apropiada;
- b. cultivo de la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de la
- 35** secuencia de ácido nucleico,
- c. opcionalmente, aislar y / o purificar el polipéptido expresado;

donde dicha célula huésped es una célula eucariota.

15. Composición farmacéutica, según la reivindicación 14, donde dicha célula huésped es *Pichia pastoris*.

5

16. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15.

10

17. La secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 16, donde dicha secuencia comprende además una secuencia que codifica un péptido señal, preferiblemente donde dicho péptido señal es el factor alpha.

18. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17.

15

19. Una célula huésped que comprende un vector según la reivindicación 18.

20. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 2 a 15, secuencia de ácido nucleico según las reivindicaciones 16-17, vector según la reivindicación 18 o célula según la reivindicación 19, para su uso en el tratamiento tumores hematológicos o sólidos.

20

21. Un proceso para la producción de una molécula según las reivindicaciones 2 a 13, que comprende las etapas de:

25

a. introducción de un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17 en una célula huésped apropiada;

b. cultivo de la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ácido nucleico,

30

c. opcionalmente, aislar y / o purificar el polipéptido expresado.

22. El proceso de producción según la reivindicación 21, donde la etapa b) se realiza a un pH de entre 4.9 y 5.2, preferiblemente a un pH de 5, y a una temperatura de entre 15 y 21 grados, preferiblemente de 18°C.

35

FIGURA 1

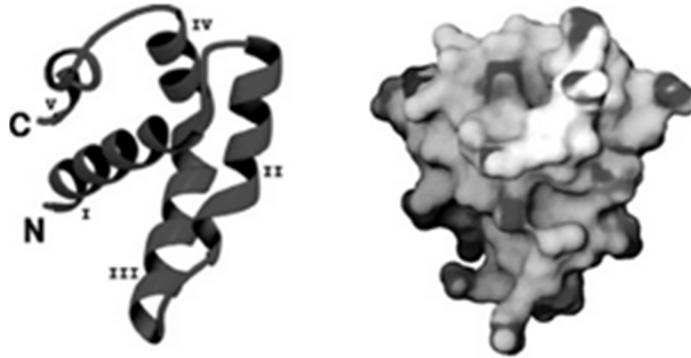


FIGURA 2

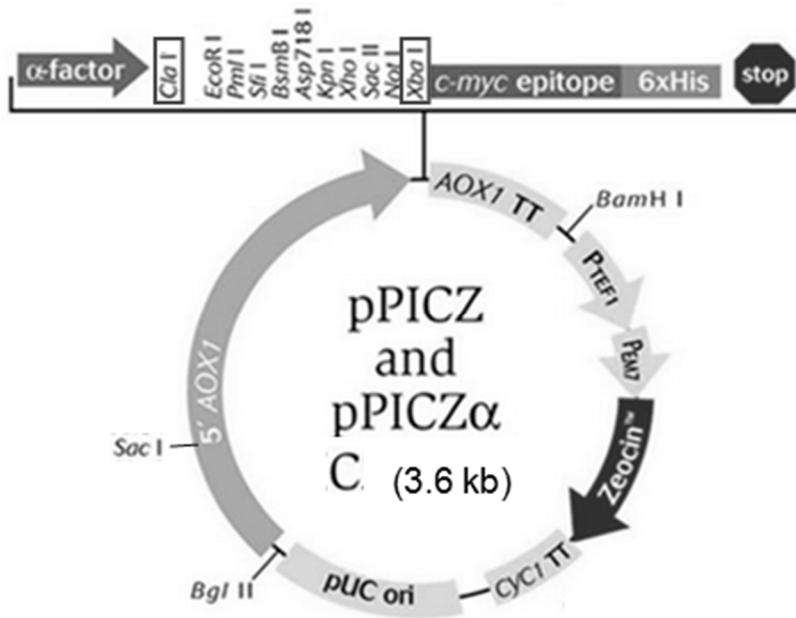


FIGURA 3

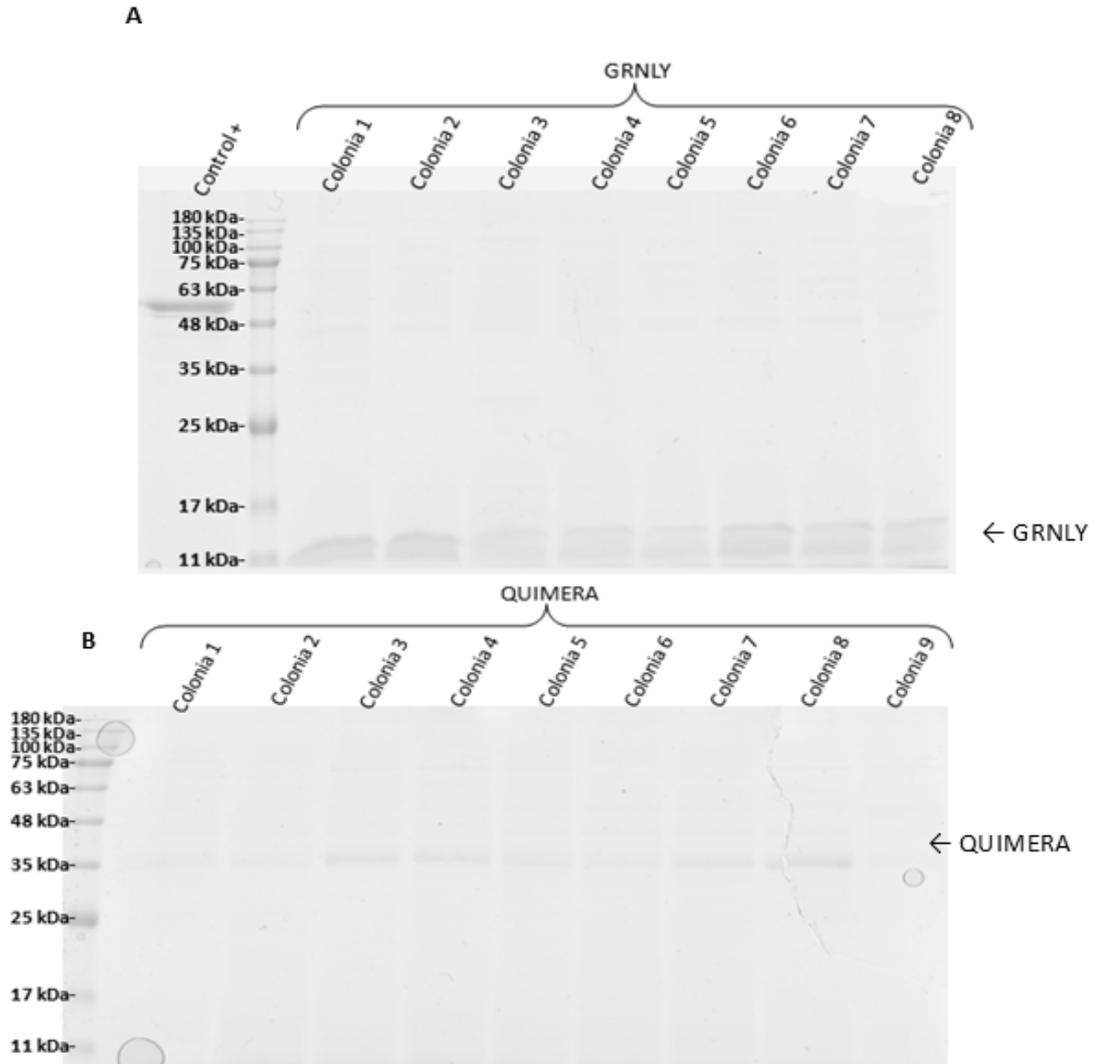


FIGURA 4

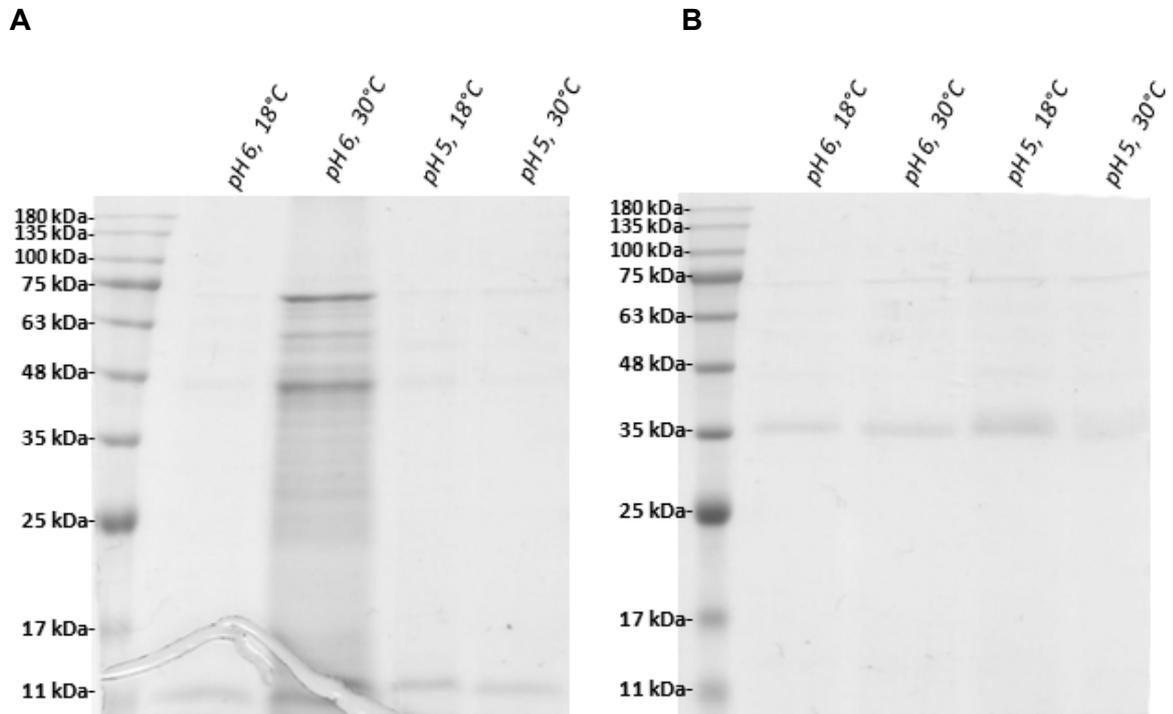
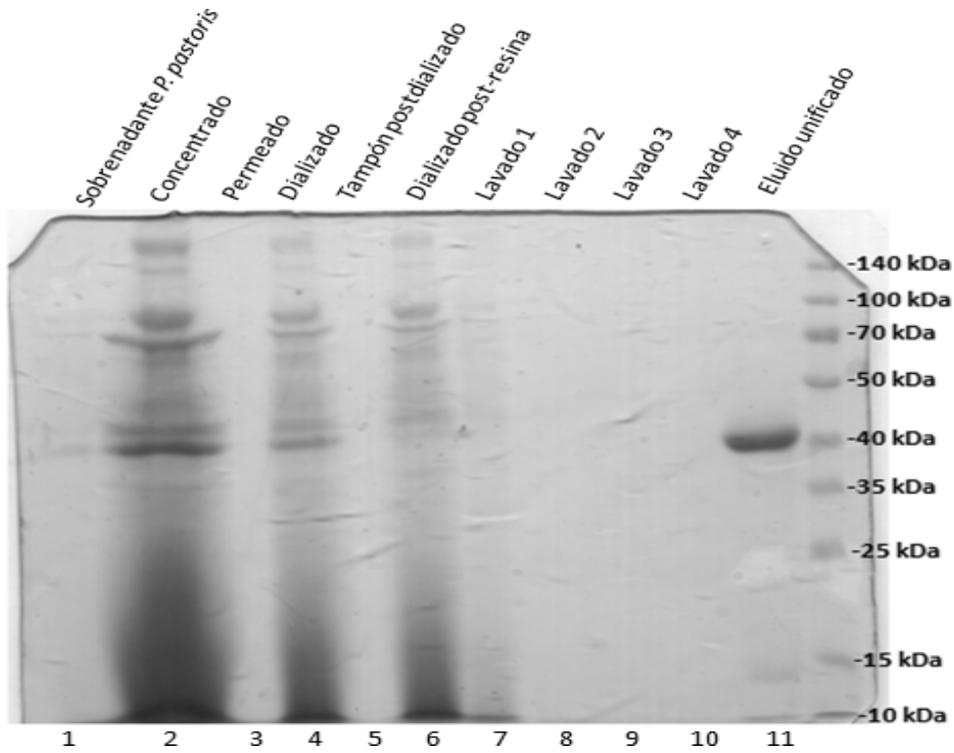


FIGURA 5

A



B

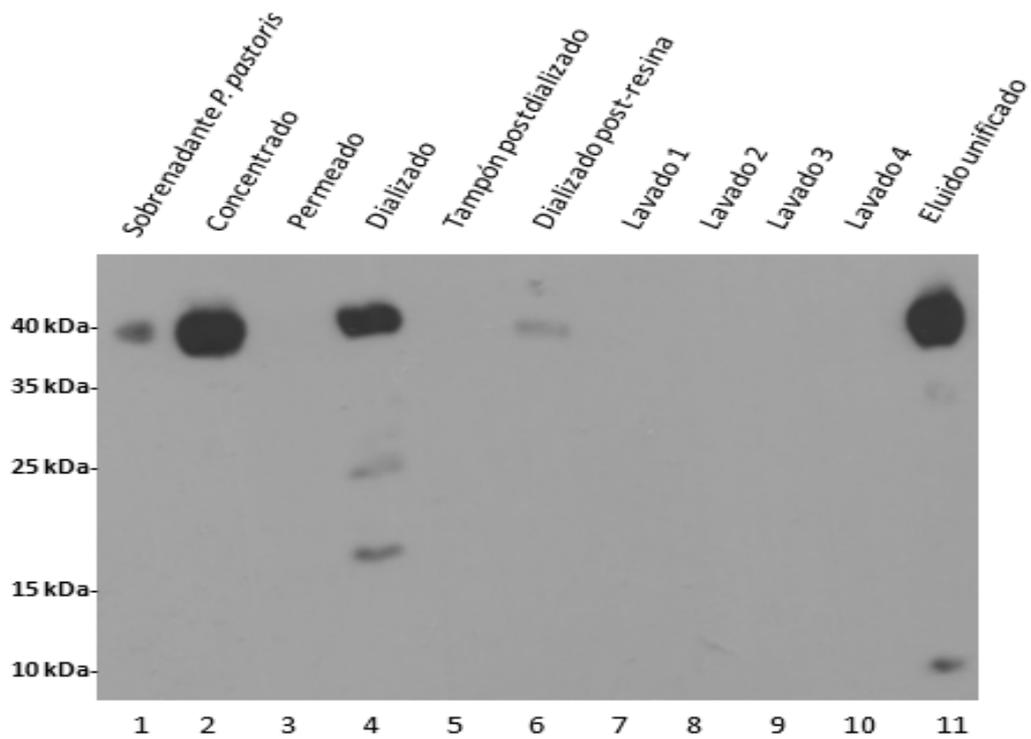
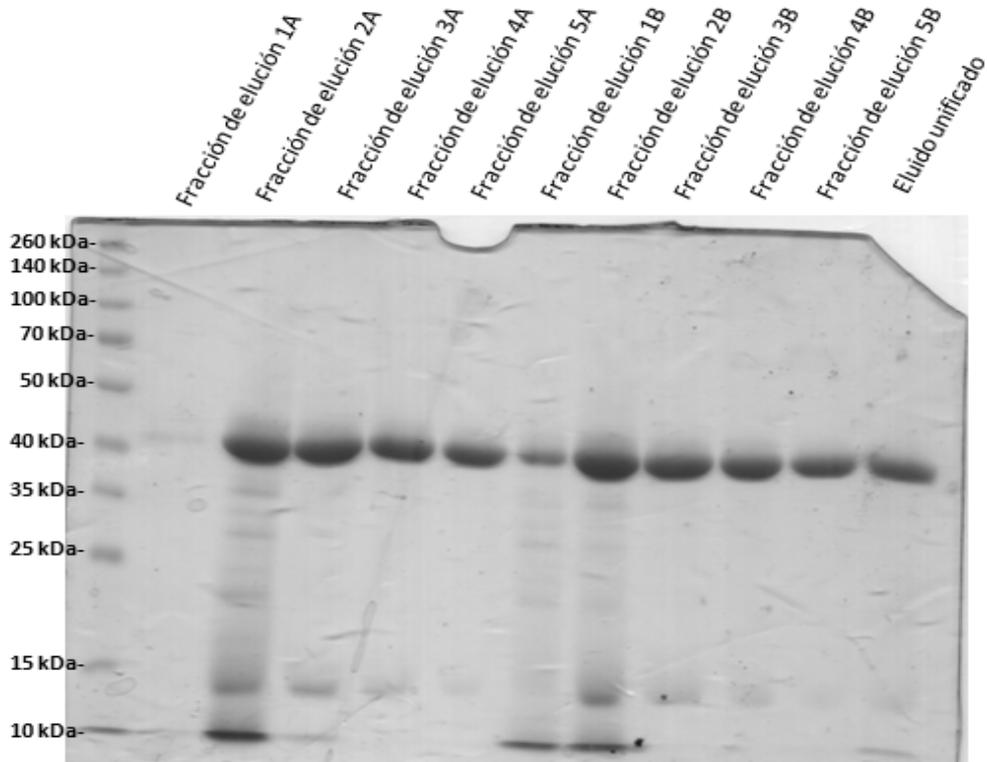


FIGURA 6

A



B

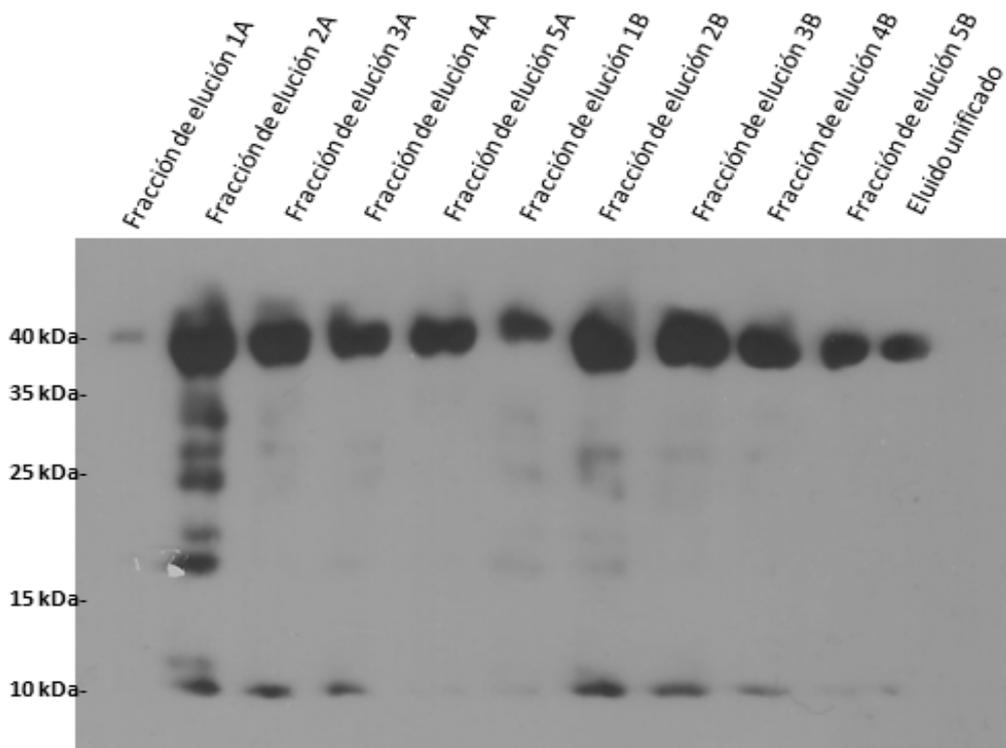


FIGURA 7

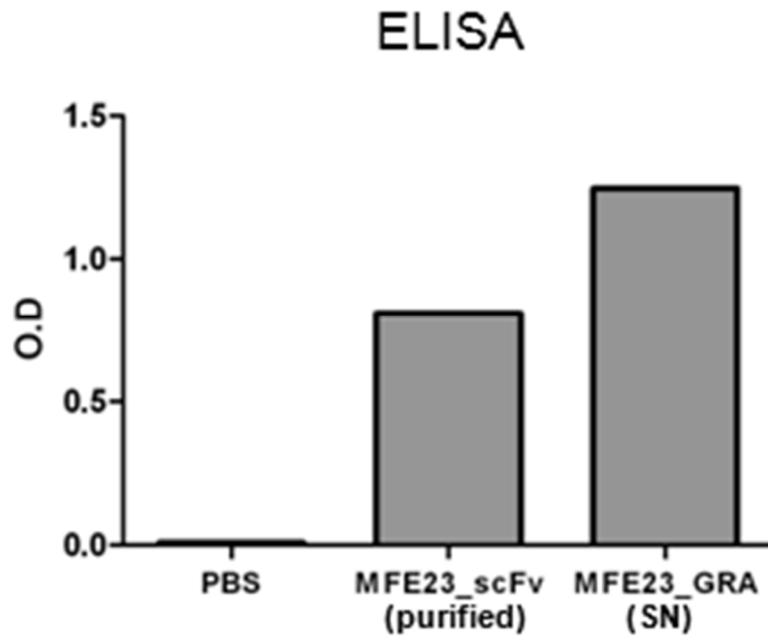
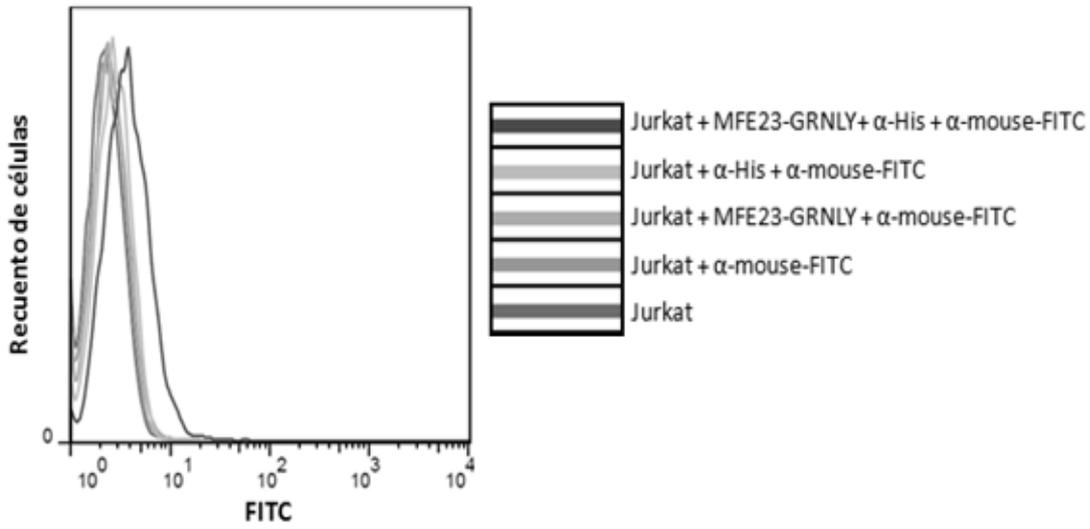


FIGURA 8

A



B

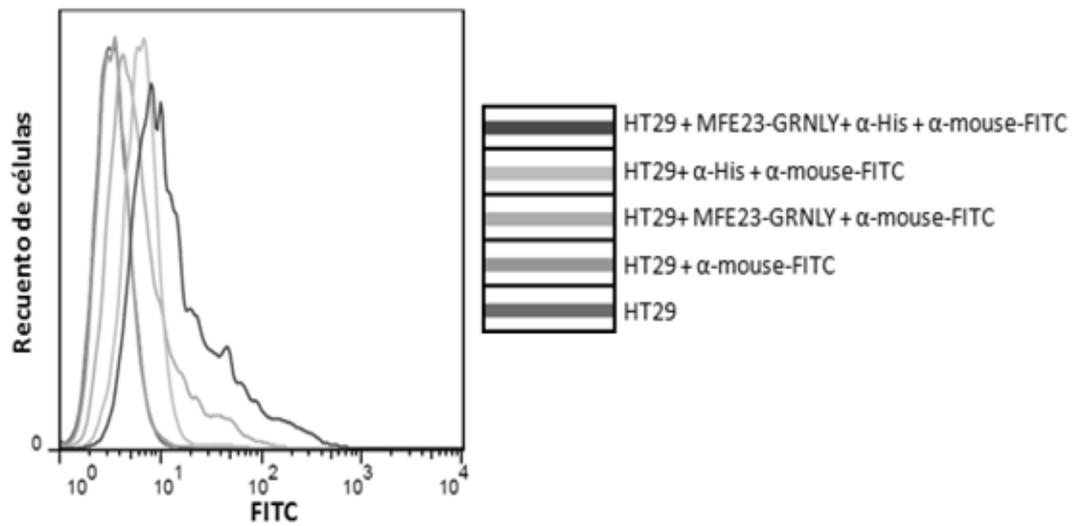
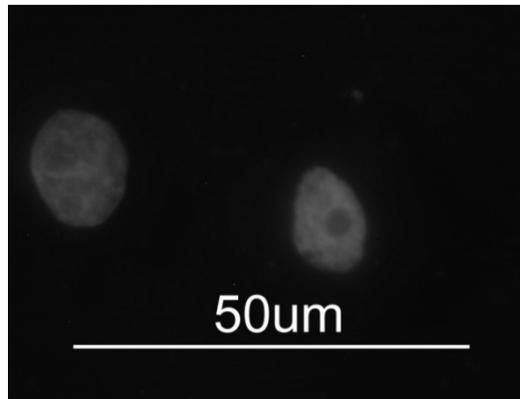


FIGURA 9

A



B

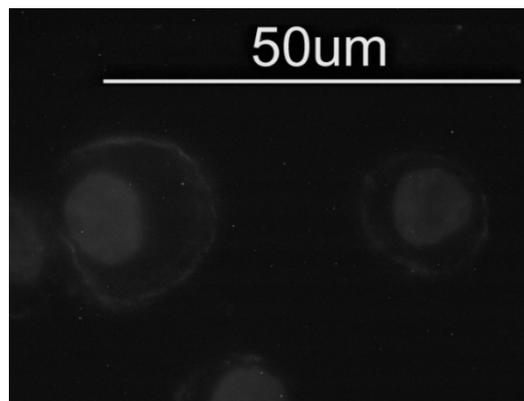


FIGURA 10

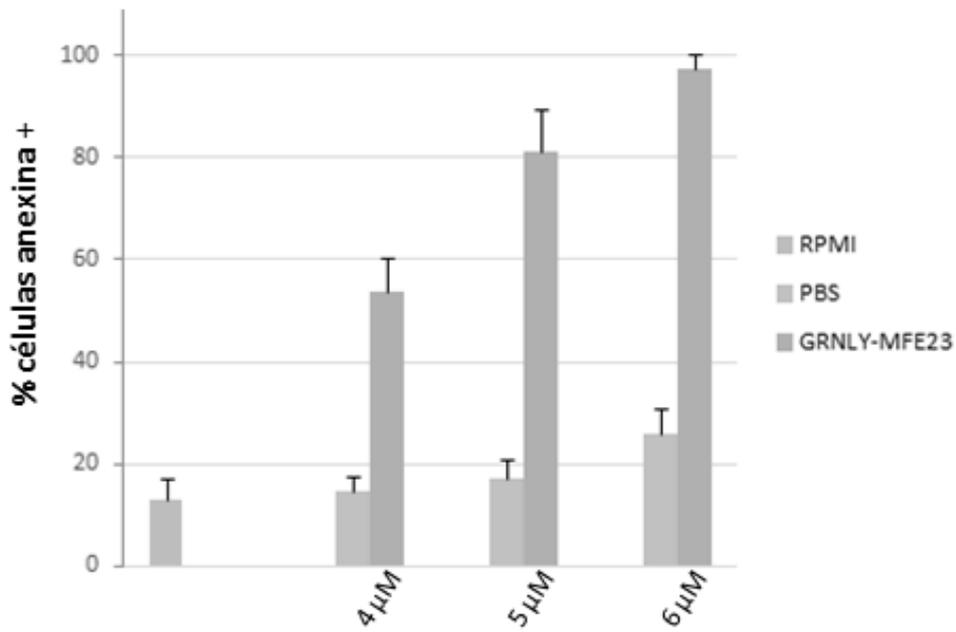


FIGURA 11

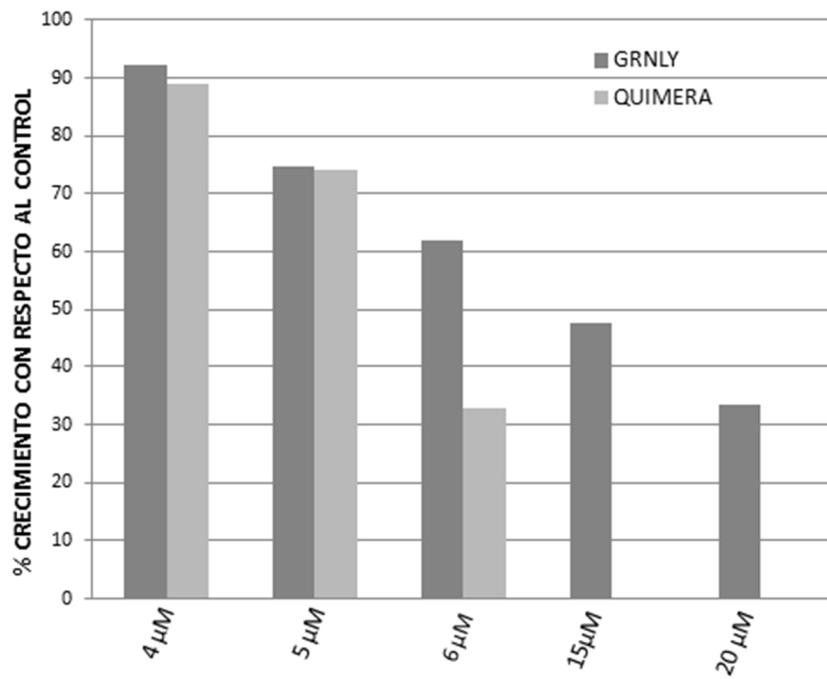


FIGURA 12

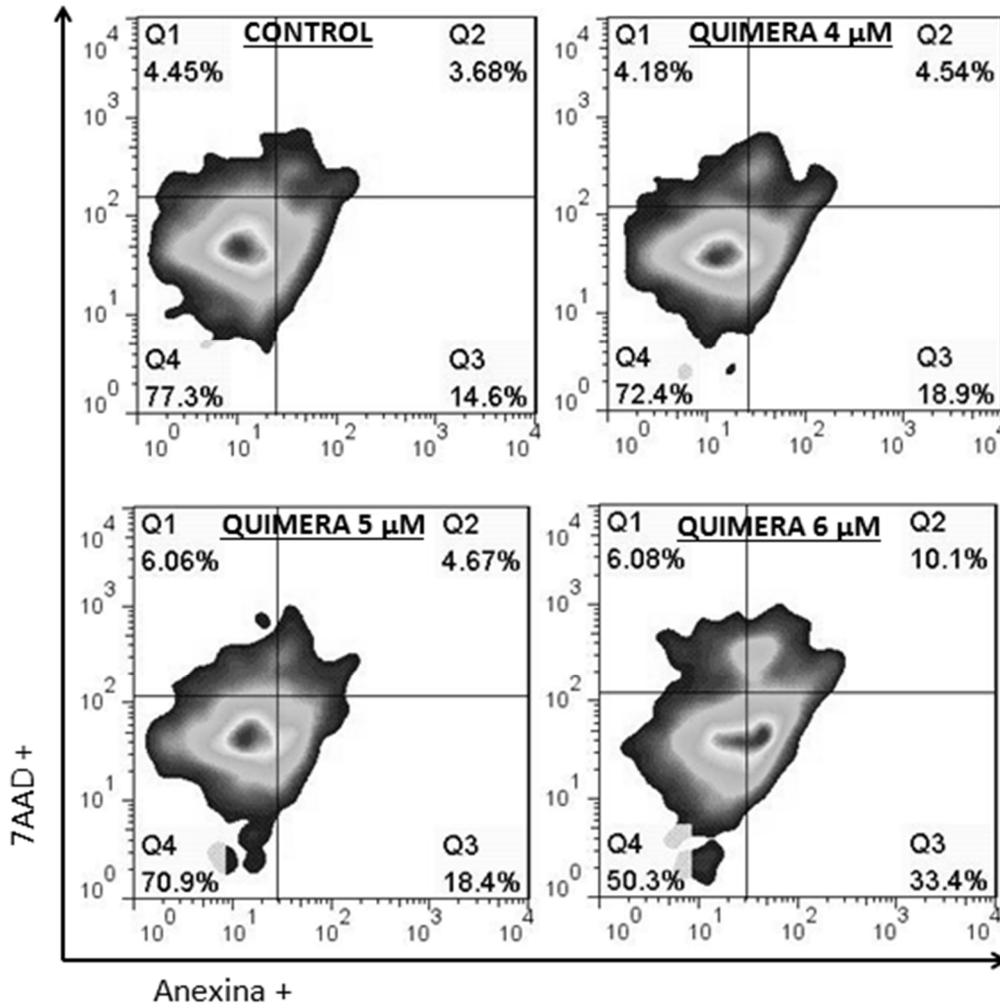


Figura 13

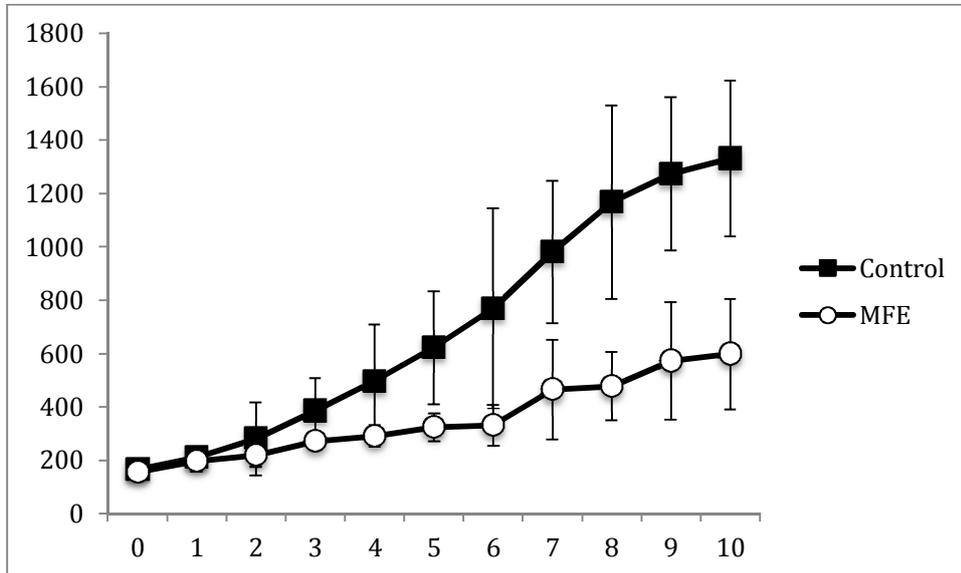


Figura 14

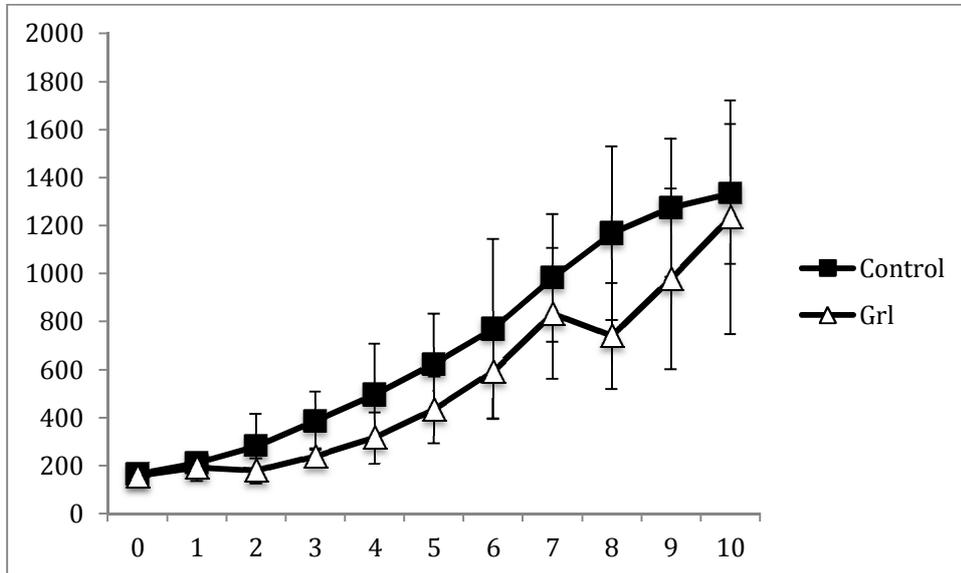


Figura 15

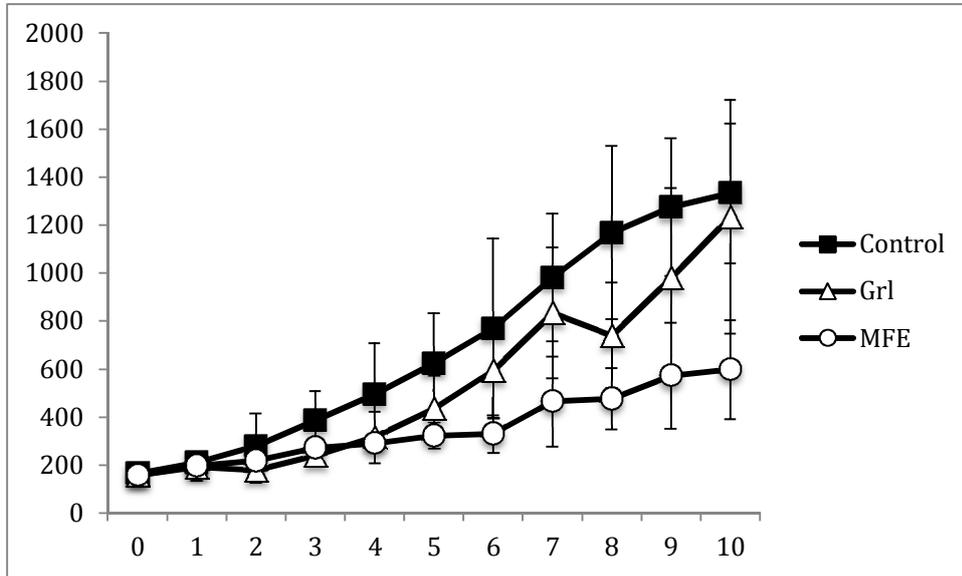


Figura 16

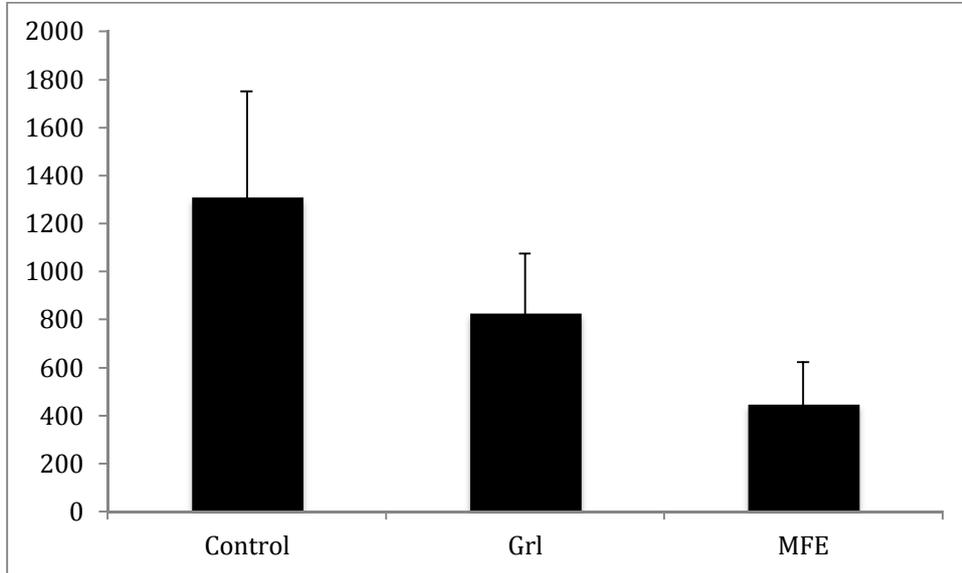


Figura 17

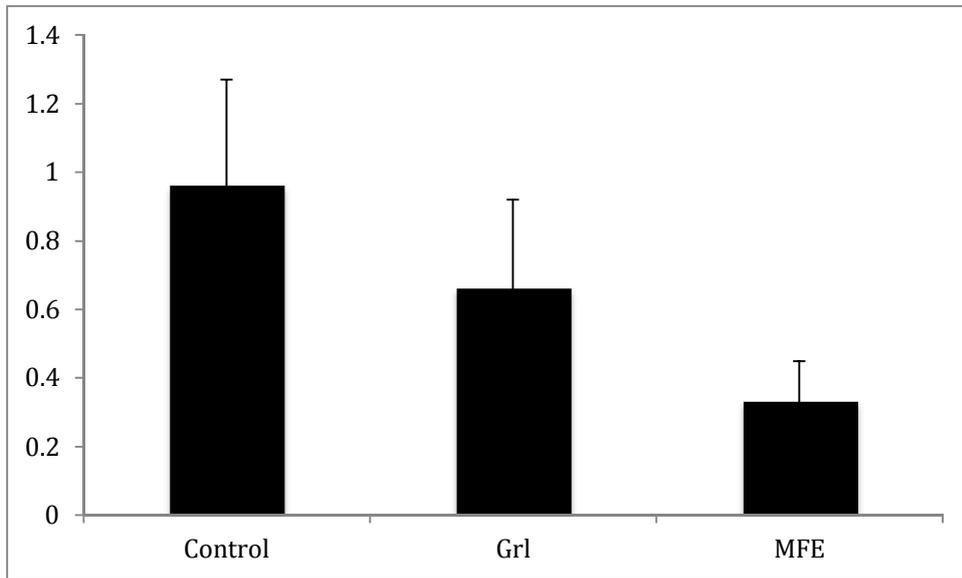


Figura 18

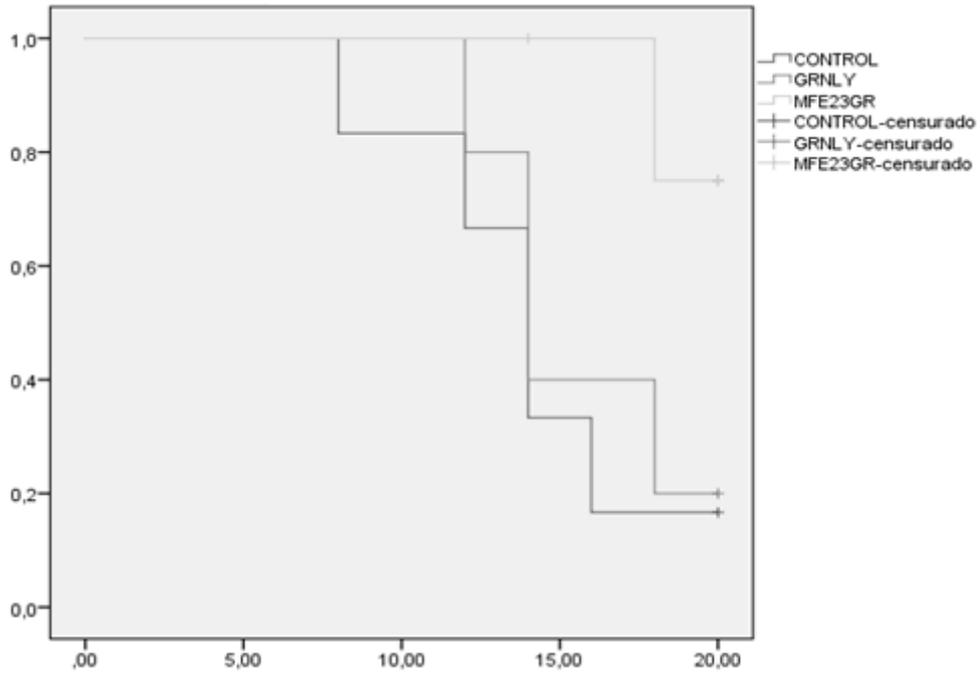
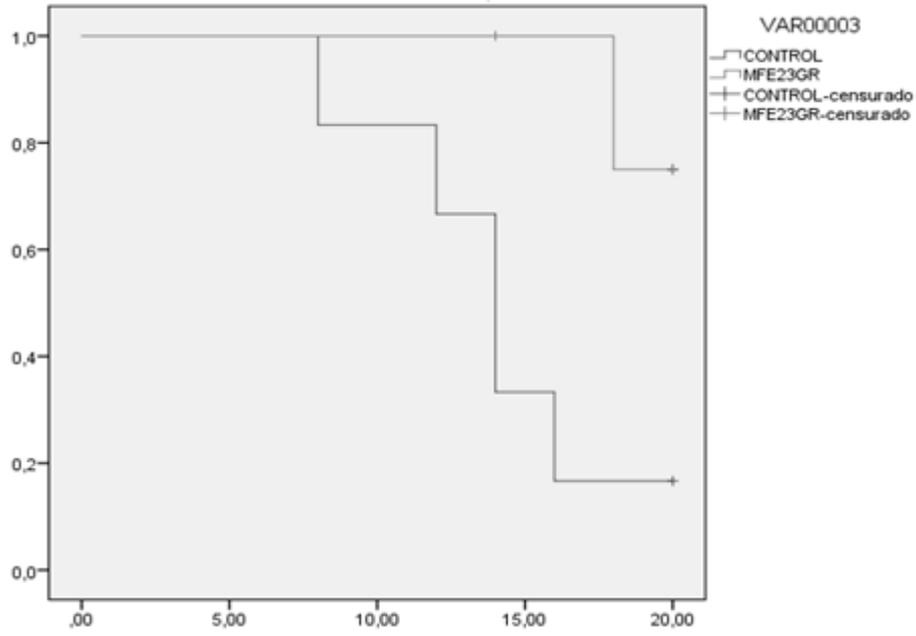


Figura 19





- ②① N.º solicitud: 201830768
②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2014122351 A1 (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA et al.) 14/08/2014, todo el documento.	1-22
Y	BLANCO-TORIBIO, A. et al. "Efficient production of single-chain fragment variable-based N-terminal trimerbodies in <i>Pichia pastoris</i> ". MICROBIAL CELL FACTORIES, 12/08/2014, Vol. 16, páginas 1-9, <DOI: 10.1186/s12934-014-0116-1>. Todo el documento, especialmente resultados.	1-8, 12-20
Y	EP 2441776 A1 (LEADARTIS, S.L.) 18/04/2012, párrafos [0021], [0023]; SEQ ID n°s 12 y 16.	9-11
Y	IBÁÑEZ PÉREZ, R. "La Granulicina como nueva terapia antitumoral". Trabajo de fin de grado de Biotecnología. Universidad de Zaragoza. Julio 2015. Todo el documento, especialmente apartados 5 y 6.	21, 22
A	CHEN, X. et al. "Fusion protein linkers: property, design and functionality". ADV. DRUG DELIV. REV. ,15/10/2013, Vol. 65, páginas 1357-1369, <DOI: 10-1016/j.addr.2012.09.039>. Todo el documento, especialmente apartado 5.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
26.12.2018

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/47 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61K47/62 (2017.01)

A61K47/68 (2017.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, HCAPLUS, EMBASE, MEDLINE, INTERNET